

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Morfología Microscópica



TESIS DOCTORAL

**Estudio de los antígenos de histocompatibilidad en los
espermatozoides humanos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Santiago Rodríguez de Córdoba

Madrid, 2015

Santiago Rodríguez de Córdoba

TP
1982
010



X-53-01832-6

ESTUDIO DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD
EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS

Departamento de Morfología Microscópica
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad Complutense de Madrid
1982



BIBLIOTECA

© Santiago Rodríguez de Córdoba
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-36703-1981

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIO DE LOS ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD
EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS

TESIS DOCTORAL

POR

SANTIAGO RODRIGUEZ DE CORDOBA

DIRECTOR DE TESIS : Dr. DON ANTONIO ARNAIZ VILLENA
PONENTE DE TESIS : Prof. DON ANGEL MARTIN MUNICIO
LUGAR DE REALIZACION: SERVICIO DE INMUNOLOGIA
CENTRO ESPECIAL "RAMON Y CAJAL"

Madrid, 1981

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Don Antonio Arnáiz Villena, Director de Tesis, por su colaboración en la planificación y realización del presente trabajo.

Al Profesor Don Angel Martin Municio, Ponente de Tesis, que con sus valiosos consejos también ha hecho posible nuestra labor.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Histocompatibilidad por su apoyo incondicional.

I N D I C E

	<u>Pág.</u>
RELEVANCIA DEL ESTUDIO DEL SISTEMA HLA EN LOS ESPERMATOZOIDES	1
<u>INTRODUCCION</u>	3
1.- CRONOLOGIA DE LAS INVESTIGACIONES EN EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL HOMBRE (SISTEMA HLA)	4
2.- GENETICA DEL SISTEMA HLA	8
A) ANTIGENOS HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6	9
- Locus HLA-A	9
- Locus HLA-B	13
- Locus HLA-C	13
- Antígenos HLA-Bw4, Bw6	13
B) ANTIGENOS HLA-D	17
C) ANTIGENOS HLA-DR	20
D) PLT	24
E) ASPECTOS MOLECULARES DE LOS ANTIGENOS HLA	25
F) OTROS GENES DENTRO DEL SISTEMA HLA	29
- Genes de la respuesta inmune	29
- Genes que codifican para componentes del complemento	30
- Otros genes	32
G) LOCALIZACION CROMOSOMICA DEL SISTEMA HLA; ORDENAMIENTO DE LOCI DENTRO DEL SISTEMA HLA	33
H) RELACIONES ENTRE LOS LOCI DEL SISTEMA HLA; DESEQUILIBRIOS DE LIGAMIENTO, GENETICA DE POBLACIONES	35
I) EVOLUCION DEL SISTEMA HLA	38
3.- IMPLICACIONES EN EL TRANSPLANTE	39
A) TRANSPLANTE RENAL	39
B) TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA	41
4.- SISTEMA HLA Y ENFERMEDAD	41
- Gen o genes responsables de las asociaciones	44
- Mecanismos por los que estos genes podrían conferir susceptibilidad a padecer estas enfermedades	45
5.- DISTRIBUCION TISULAR DE LOS ANTIGENOS HLA	46

- II -

6.- FUNCION BIOLOGICA DEL SISTEMA HLA	47
7.- SISTEMA HLA EN ESPERMATOZOIDES	52
A) ANTIGENOS HLA-A,-B,-C EN ESPERMATOZOIDES	52
B) PRODUCTOS DE LA REGION HLA-D/DR EN ESPERMATOZOIDES	55
C) ACTIVACION DE GENES LIGADOS AL SISTEMA H-2 DURANTE LA ES- PERMATOGENESIS	58
D) SISTEMA HLA Y FERTILIDAD	58
<u>MATERIALES Y METODOS</u>	61
<u>MATERIALES Y SU OBTENCION</u>	62
1.- MEDIOS DE CULTIVO, TAMPONES Y REACTIVOS MENCIONADOS EN EL TEXTO	63
2.- OBTENCION DE LINFOCITOS TOTALES	66
3.- OBTENCION DE LINFOCITOS B	66
4.- CONGELACION DE LINFOCITOS	68
5.- SEMEN	69
A) OBTENCION DE PLASMA SEMINAL	69
B) OBTENCION DE CELULAS SEMINALES TOTALES	69
C) OBTENCION ESPERMATOZOIDES PUROS	70
D) OBTENCION DE CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES (C.S. no E.)	71
<u>DETERMINACION DE LOS ANTIGENOS HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6</u>	72
1.- TEST DE MICROCITOTOXICIDAD SOBRE LINFOCITOS	73
2.- TEST DE MICROCITOTOXICIDAD SOBRE ESPERMATOZOIDES	74
3.- ANTISUEROS ANTI-HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6 UTILIZADOS	76
<u>DETERMINACION DE LOS ANTIGENOS HLA-DR</u>	79
1.- TEST DE MICROCITOTOXICIDAD SOBRE LINFOCITOS B	80
2.- TEST DE MICROCITOTOXICIDAD SOBRE ESPERMATOZOIDES	80
3.- ANTISUEROS ANTI-HLA-DR UTILIZADOS	81

- III -

<u>ABSORCIONES</u>	82
1.- ABSORCION EN ANTISUEROS DE LA ACTIVIDAD DIRIGIDA CONTRA ANTIGENOS TISULARES NO HLA	83
2.- ABSORCIONES EN ANTISUEROS DE LA ACTIVIDAD ANTI-HLA	83
<u>DETECCION DE FACTOR B</u>	85
1.- DETECCION DE FACTOR B	86
<u>DETECCION DE DETERMINANTES HLA-D</u>	88
1.- CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS (MLC)	89
- Preparación de las células homocigotas de tipaje (HTC); tratamiento con Mitomicina C.	89
- Preparación de los linfocitos respondedores	89
- Organización de los cultivos	89
2.- ANALISIS ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS	91
3.- ASIGNACION DE ANTIGENOS	92
4.- CELULAS HOMOCIGOTAS DE TIPAJE (HTC) UTILIZADAS	94
<u>CULTIVOS MIXTOS ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS</u>	95
1.- CULTIVOS MIXTOS ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS	96
<u>CULTIVO MIXTO CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES (C.S. no E.)-LINFOCITOS.</u>	97
1.- CULTIVO MIXTO CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES (C.S. no E.)-LINFOCITOS	98
<u>RESULTADOS</u>	99
<u>EXPRESION SELECTIVA DE PRODUCTOS HLA-A₁-B₂-C₂-Bw4, Bw6 Y -DR EN ESPERMATOZOIDES.</u>	100
1.- SEROLOGIA HLA-A; PRESENCIA DE ANTIGENOS HLA-A EN ESPERMATOZOIDES	101
2.- SEROLOGIA HLA-B; PRESENCIA DE ANTIGENOS HLA-B EN ESPERMATOZOIDES	107
3.- PRESENCIA DE ACTIVIDAD ANTI-ESPERMATOZOIDES EN SUEROS ANTI-HLA-A Y ANTI-HLA-B	114
4.- SEROLOGIA HLA-C; AUSENCIA DE ANTIGENOS HLA-C EN ESPERMATOZOIDES	116

- IV -

5.- SEROLOGIA HLA-Bw4, Bw6; AUSENCIA DE ANTIGENOS Bw4, Bw6 EN ESPERMATOZOIDES	119
6.- SUEROS ANTI-HLA POLIESPECIFICOS	122
7.- SEROLOGIA HLA-DR; AUSENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR EN ESPERMATOZOIDES	124
<u>EXPRESION DE ANTIGENOS HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6 EN CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES</u>	127
1.- EXPRESION DE ANTIGENOS HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6 EN CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES	128
A) HLA-A	128
B) HLA-B	128
C) HLA-C	129
D) HLA-Bw4, Bw6	129
<u>EXPRESION DE LOS ESPERMATOZOIDES DE PRODUCTOS CODIFICADOS POR GENES DEL SISTEMA HLA DIFERENTES DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD FACTOR B DE LA VIA ALTERNATIVA DEL COMPLEMENTO.</u>	134
<u>TIPAJE HLA-D; CORRELACION DE ANTIGENOS HLA-D Y HLA-DR EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION ESPAÑOLA</u>	137
1.- TIPAJE HLA-D; CORRELACION DE ANTIGENOS HLA-D Y HLA-DR EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION ESPAÑOLA	138
<u>CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS; AUSENCIA DE PRODUCTOS HLA-D EN ESPERMATOZOIDES.</u>	147
1.- CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS	148
2.- CULTIVO MIXTO LINFOCITOS-CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES (C.S. no E.)	161
3.- AUSENCIA EN ESPERMATOZOIDES DE PRODUCTOS HLA-D	163
4.- EXPRESION EN CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES (C.S. no E.) DE PRODUCTOS HLA-D	173

- V -

<u>DISCUSION</u>	177
1.- EXPRESION SELECTIVA DE LOS ANTIGENOS HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6 Y DE Bf EN ESPERMATOZOIDES; GENES VECINOS DE EXPRESION ALTERNANTE	178
A) EXPRESION DE ANTIGENOS HLA-A Y HLA-B	178
- Citotoxicidad especifica de sueros anti-HLA-A y anti-HLA-B sobre espermatozoides	178
- Los experimentos de absorción de sueros anti-HLA-A, HLA-B confirman los resultados obtenidos en los experimentos de citotoxicidad	181
B) NO DETECCION DE ANTIGENOS HLA-C, NI DE ANTIGENOS HLA-Bw4, Bw6 EN ESPERMATOZOIDES	183
C) AUSENCIA DE FACTOR B EN LOS ESPERMATOZOIDES	185
2.- ESTIMULACION DE LINFOCITOS EN CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS: SU IRREGULARIDAD Y POSIBLES CAUSAS	186
3.- CORRELACION DE LOS ANTIGENOS HLA-D Y HLA-DR; EN POBLACION Y EN LAS CELULAS	189
A) CORRELACION ENTRE LOS ANTIGENOS HLA-D Y HLA-DR EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION ESPAÑOLA	189
B) AUSENCIA DE PRODUCTOS DE LA REGION HLA-D/DR EN ESPERMATOZOIDES	191
- Ausencia de antígenos HLA-DR en espermatozoides	191
- Ausencia de determinantes HLA-D en espermatozoides	193
<u>CONCLUSIONES</u>	196
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	198

--ooOoo--

RELEVANCIA DEL ESTUDIO DEL SISTEMA HLA EN LOS ESPERMATOZOIDES HUMANOS.

El Complejo Principal de Histocompatibilidad en el hombre (Sistema HLA) se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma nº 6.

Como los Complejos Principales de Histocompatibilidad de otras especies suficientemente estudiadas contiene genes que codifican para los antígenos de histocompatibilidad (antígenos HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6, -D y -DR); genes que codifican para factores del complemento, tanto de la vía clásica (C2, C4, (C8?)) como de la vía alternativa (Factor B) y genes de la respuesta inmune, entre otros.

Se han detectado productos codificados por el Sistema HLA en la superficie de casi la totalidad de las células nucleadas del organismo humano estudiadas. Se sabe, además, que algunos de estos productos están selectivamente expresados solo en determinadas estirpes celulares.

Aunque se comprobó, casi a raíz de su descubrimiento, que el Sistema HLA es el sistema genético humano más importante en el rechazo de injertos, se desconoce el papel biológico real de los antígenos de histocompatibilidad.

Recientemente se han presentado pruebas a favor de la participación de los antígenos de histocompatibilidad en los fenómenos de contacto y reconocimiento celular (entre ellos los de la respuesta inmune) y en los procesos de la fertilización de animales inferiores y plantas.

La susceptibilidad a padecer algunas enfermedades está estrechamente asociada a determinados antígenos HLA, de manera que éstos antígenos de histocompatibilidad pueden utilizarse como marcadores del gen, o genes, que confieren esta susceptibilidad.

En función de los hechos más arriba expuestos, la relevancia del estudio de la expresión de los antígenos de histocompatibilidad en los espermatozoides humanos puede resumirse en los siguientes puntos:

- 1.- Los resultados presentados por diferentes grupos en cuanto a la expresión de los antígenos de histocompatibilidad en los espermatozoides humanos son contradictorios. Además, no se ha estudiado en estas células la expresión de la totalidad de los antígenos de histocompatibilidad y de otros productos de genes asociados.
De cara a determinar el posible papel de los antígenos HLA en fertilización es necesario saber si los espermatozoides expresan estos antígenos.
- 2.- En el ratón se ha comprobado que existe expresión selectiva de antígenos de histocompatibilidad y productos de genes asociados en los espermatozoides. Se desconoce si en los espermatozoides humanos existe también una expresión selectiva de los productos del Sistema HLA y cuáles son los que se expresan.
- 3.- Dado que los espermatozoides son células haploides, la expresión de productos del Sistema HLA, en concreto la expresión de productos HLA-D, sería de gran interés desde el punto de vista técnico del tipaje HLA-D, ya que entonces, estas células podrían utilizarse como sustitutas de las células estimuladoras del cultivo mixto de linfocitos, homocigotas en HLA-D, muy escasas y de difícil obtención. Los espermatozoides presentarían además la gran ventaja de ser células que no pueden dividirse siendo, por tanto, exclusivamente estimuladoras.
- 4.- La presencia de antígenos HLA en la superficie de los espermatozoides plantearía la posibilidad de que, en algunos casos, estos antígenos pudieran utilizarse como marcadores genéticos de espermatozoides portadores de genes ligados al Sistema HLA que confieren susceptibilidad a padecer determinadas enfermedades. Ello permitiría la identificación de estos espermatozoides y su eliminación previa a una fertilización artificial.

INTRODUCCION

1.- CRONOLOGIA DE LAS INVESTIGACIONES EN EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL HOMBRE (SISTEMA HLA).

Dausset, 1954, aportó la primera prueba de la existencia de un sistema antigénico leucocitario al observar la presencia de leucoaglutininas en el suero de individuos que habían recibido un elevado número de transfusiones de sangre. Posteriormente Dausset, 1958, confirmó esta suposición cuando observó que los sueros de 7 de estos individuos politransfundidos reaccionaban de un modo similar aglutinando los leucocitos del 60% de los individuos de la población francesa, mientras que no aglutinaban los leucocitos de ninguno de estos 7 individuos. Dausset llamó a este antígeno, definido por el suero de estos 7 pacientes, Isoantígeno MAC (ahora conocido como HLA-A2+HLA-A28), describiendo así el primer antígeno HLA.

En este mismo año Payne y Rolfs (1958) y van Rood et al. (1958) mostraron independientemente que el embarazo (actualmente fuente principal de sueros anti-HLA) podía inducir la formación de anticuerpos anti-leucocitarios.

Van Rood (1962) a pesar de la imperfecta serología existente en esa época y mediante análisis de computador describió el sistema dialélico 4a,4b (hoy Bw4,Bw6) y por medio de absorciones encontró que estos antígenos estaban presentes en la mayor parte de los tejidos humanos.

Simultáneamente, Shulman et al. (1962,1964) mostraron que el tipaje de antígenos leucocitarios hasta entonces basado en reacciones de leucoaglutinación podía realizarse mediante un test de fijación de complemento utilizando plaquetas como fuente del antígeno. Sin embargo, la existencia de sueros que reaccionaran suficientemente fuerte en este test era bastante rara y fue, por tanto, muy importante cuando en 1964 Terasaki y McClelland introdujeron el test de microlinfocitotoxicidad mucho más sensible y que con varias modificaciones ha mantenido su papel principal en el tipaje serológico de los antígenos HLA hasta nuestros días.

Después del descubrimiento del primer antígeno leucocitario el número de estos antígenos fue aumentando rápidamente y ya en 1965 Dausset et al. (1965) y von Rood et al. (1965) sugirieron que la mayor parte de estos antígenos pertenecían a un mismo y único sistema genético.

Las pruebas definitivas de que esta era así se obtuvieron en el III "Workshop" de Histocompatibilidad (1967) (1), cuando 16 equipos diferentes tiparon la misma muestra de familias italianas seleccionadas por Ceppellini et al. (1967, 1968). Las pruebas fueron tan contundentes que un Comité de Nomenclatura de la O.M.S. aprobó denominar al nuevo sistema genético como Sistema HL-A (1^{er} (A) Sistema de Antígenos Leucocitarios Humanos descubierto) (2).

Kissmeyer-Nielsen et al. (1968) presentaron un modelo simplificado del Sistema HLA compuesto por 2 loci estrechamente ligados controlando 2 series de antígenos (LA y FOUR, hoy HLA-A y HLA-B). Este modelo fue apoyado por el descubrimiento de una familia con un sobrecruzamiento entre los dos loci, Kissmeyer-Nielsen et al. (1969) y posteriormente confirmado durante el IV "Workshop" de Histocompatibilidad (1970).

La existencia de una tercera serie (AJ, hoy HLA-C) estrechamente asociada con la HLA-B, que ya había sido sugerida por Sandberg et al. (1970), fue confirmada por Löw et al. (1974) quien con su recombinante entre HLA-B y HLA-C, además localizó este nuevo locus entre los loci HLA-A y HLA-B.

Bernoco et al. (1973) mostraron que los antígenos HLA-A y HLA-B aparecían en moléculas diferentes en la membrana celular y Solheim et al. (1973) encontraron que los antígenos HLA-C también aparecían en moléculas diferentes a HLA-A y HLA-B.

(1) Conviene señalar aquí que el espectacular desarrollo del conocimiento del Sistema HLA en tan poco tiempo solo ha sido posible gracias a una serie de reuniones internacionales (Workshops) que se vienen realizando desde 1964 y al intercambio permanente de material biológico (células, sueros, etc.), de técnicas y de ideas que han hecho del Sistema HLA el sistema genético más complejo y mejor conocido en el hombre.

(2) En 1978 el Sistema HL-A pasó a ser definitivamente Sistema HLA (Human Leukocyte Antigens; Sistema de Antígenos Leucocitarios Humano).

La prueba de que el Sistema HLA era el sistema principal de histocompatibilidad en el hombre la obtuvieron Ceppellini et al. (1969) y Amos et al. (1969) en experimentos con injertos de piel.

El V "Workshop" de Histocompatibilidad (1972) tuvo por objeto el estudio del Sistema HLA en distintas poblaciones. 29 laboratorios tiparon 54 poblaciones de diferentes partes del mundo con la misma batería de sueros anti-HLA. Ocurrió que muchos antígenos HLA que estaban bien definidos en caucasoides no lo estaban tanto en otros grupos étnicos y se encontró que algunos antígenos HLA estaban presentes solo en algunas poblaciones.

En 1964 Bain y Löwestein (1964) y Bach y Hirschhorn (1964) habían encontrado que los linfocitos de individuos diferentes sufrían transformación blástica y proliferaban cuando se mezclaban y cultivaban juntos "in vitro" (Cultivo Mixto de Linfocitos: MLC: Mixed Lymphocyte Culture).

En 1967, Bach y Amos encontraron que el cultivo mixto de linfocitos era negativo cuando los individuos que se utilizaban como donantes de linfocitos eran HLA idénticos y Kissmeyer-Nielsen et al. (1970) demostraron que el cultivo mixto de linfocitos era independiente de los antígenos de las series HLA-A, -B y -C.

Durante el VI "Workshop" de Histocompatibilidad (1975) quedó definitivamente definido el locus HLA-D como principal responsable del cultivo mixto de linfocitos, localizado en la proximidad del locus HLA-B y fuera del segmento entre HLA-A y HLA-B. Además, se estableció definitivamente la existencia del locus HLA-C localizado entre HLA-A y HLA-B.

En 1973 van Leeuwen et al. presentaron pruebas de que era posible tipar serológicamente algunos antígenos estrechamente ligados a los antígenos HLA-D que se expresaban en los linfocitos B. Estos antígenos hoy conocidos como HLA-DR (HLA-D Relacionados; HLA-D Related) fueron el objeto principal del VII "Workshop" de Histocompatibilidad (1977).

Por otro lado, Amiel, 1967, había encontrado que la enfermedad de Hodgkin se daba preferentemente en individuos portadores del antígeno HLA-Bw35. En 1972 se encontró que existía una fuerte asociación entre enfermedades como Celiaca.

o Psoriasis a determinados antígenos HLA, y al año siguiente se describió la asociación más fuerte encontrada hasta la fecha, HLA-B27 y Espondilitis anquilosante (Brewerton et al. 1973, Schlosstein et al. 1973).

El estudio del Sistema HLA y la susceptibilidad a padecer determinadas enfermedades fue uno de los objetivos del VIII "Workshop" de Histocompatibilidad 1980. Se encontró que para algunas enfermedades la susceptibilidad estaba más fuertemente asociada a antígenos HLA-DR que a los antígenos HLA-A, -B y -C. Sin embargo, el objetivo principal de este VIII "Workshop" de Histocompatibilidad fue el estudio de los antígenos HLA en relación al trasplante de órganos.

Actualmente se plantea la posibilidad de que existan dentro del Sistema HLA genes que determinen la capacidad o no de respuesta a determinados antígenos, genes que serían equivalentes a los genes de la respuesta inmune (Ir) descritos en el ratón. De hecho en los últimos años se han aportado pruebas a favor de su existencia.

El hecho de que ciertos componentes del complemento, tanto de la vía alternativa como de la vía clásica, se encuentren codificados dentro del Sistema HLA y las recientes pruebas de la participación de los antígenos codificados por la región HLA-D/DR en los mecanismos de la respuesta inmune, a nivel de los procesos de cooperación entre monocitos, linfocitos T y linfocitos B, y del papel fundamental de los antígenos HLA-A, -B, y -C en la lisis de células infectadas por virus o conjugadas con haptenos por los linfocitos T citotóxicos, esbozan el planteamiento actual hacia el entendimiento del significado biológico del Sistema HLA.

2.- GENETICA DEL SISTEMA HLA.

Como ha podido comprobarse, o pesar del relativamente poca tiempo transcurrido desde el descubrimiento del primer antígeno de Histocompatibilidad, el Sistema HLA es el sistema genético humano más complejo conocido hasta la fecha. Este pequeño fragmento de cromosoma contiene muchos genes (tal vez más de 1.000) que codifican para una gran variedad de caracteres; los primeros que se descubrieron y que son los que han dado nombre al sistema fueron los antígenos de Histocompatibilidad, sistema de aloantígenos en los linfocitos. Posteriormente se ha demostrado que constituyen la barrera principal de histocompatibilidad en el hombre (Ceppellini et al., 1969; Amos et al., 1969).

En la actualidad estos antígenos de histocompatibilidad se agrupan en 3 categorías:

- 1.- Antígenos HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6; fácilmente detectables por los métodos serológicos habituales (antígenos serológicamente detectables, SD), presentes en la mayoría de las células nucleadas.
- 2.- Antígenos HLA-D; detectados en el cultivo mixto de linfocitos, MLC, (antígenos definidos por linfocitos, LD; o determinantes que activan los linfocitos, Lad (Lymphocytes activating determinants)).
- 3.- Antígenos HLA-DR; estrechamente relacionados con los antígenos HLA-D pero que pueden ser detectados por métodos serológicos especiales. Los antígenos HLA-D y HLA-DR están presentes solo en determinadas estirpes celulares.

Además de los antígenos de Histocompatibilidad el Sistema HLA contiene genes de la respuesta inmune y genes que codifican para componentes del Sistema del Complemento, entre otros.

Todos los sistemas principales de Histocompatibilidad en los mamíferos estudiados contienen estos tres tipos de genes: antígenos de Histocompatibilidad, factores del complemento y genes de la respuesta inmune (Götze, 1977).

A) ANTIGENOS HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6.

Estos antígenos son detectados normalmente en los linfocitos de sangre periférica por anticuerpos presentes en el suero de individuos inmunizados por el embarazo o transfusiones. Para su detección se utiliza generalmente el llamado test de microlinfocitotoxicidad, descrito más adelante en el apartado Materiales y Métodos.

Es un hecho bien establecido que los antígenos HLA-A,-B y -C están codificados por 3 loci diferentes aunque estrechamente ligados entre sí y que su transmisión es autosómica y dominante. (van Rood, 1965; Curtoni et al., 1967 ; Terasaki, 1970; Dausset y Colombani, 1973; Kissmeyer-Nielsen, 1975; Bodmer et al., 1978)

- Locus HLA-A (previamente LA o FIRST).

El locus HLA-A contiene más de 20 alelos diferentes, cada uno de los cuales se corresponde con alguna de las especificidades HLA-A detectadas en la actualidad y que se relacionan en la Tabla I . Las frecuencias génicas encontradas para cada uno de estos antígenos HLA-A varían en los distintos grupos étnicos estudiados, incluso hay antígenos HLA-A ausentes, o por el contrario, característicos de determinadas poblaciones. Las frecuencias génicas de los antígenos HLA-A en cada uno de los grupos étnicos principales se muestran en la Tabla II . La suma de las frecuencias génicas de todos los antígenos HLA-A detectados es superior al 90%, lo que quiere decir que en la actualidad, excepto para aquellos antígenos excepcionalmente raros o para las subdivisiones que pudieran establecerse de los antígenos ya definidos, existen antisueros que detectan casi la totalidad de los productos codificados por este locus.

Algunos antígenos HLA-A pueden agruparse entre sí formando "grupos de reacción cruzada". Estos grupos de reacción cruzada están bien definidos y se relacionan en la Tabla III .

RELACION DE ANTIGENOS HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6, -D y -DR

HLA-A	HLA-B	HLA-C
A1	B5	CW1
A2	B7	CW2
A3	B8	CW3
A9	B12	CW4
A10	B13	CW5
A11	B14	CW6
AW19	B15	CW7
AW23 (9)	BW16	CW8
AW24 (9)	B17	
A25 (10)	B18	
A26 (10)	BW21	
A29	BW22	HLA-D
A29	B27	DW1
AW30	BW35	DW2
AW31	B37	DW3
AW32	BW38 (W16)	DW4
AW33	BW39 (W16)	DW5
AW34	B40	DW6
AW36	BW41	DW7
AW43	BW42	DW8
	DW44 (12)	DW9
	DW45 (12)	DW10
	BW46	DW11
	BW47	DW12
	BW48	
	BW49 (W21)	HLA-DR
	BW50 (W21)	DR1
	BW51 (5)	DR2
	BW52 (5)	DR3
	BW53	DR4
	BW54 (W22)	DR5
	BW55 (W22)	DRW6
	BW56 (W22)	DR7
	BW57 (17)	DRW8
	BW58 (17)	DRW9
	DW59	
	BW60 (40)	DRW10
	BW61 (40)	
	BW62 (15)	
	BW63 (15)	
	BW4	
	BW6	

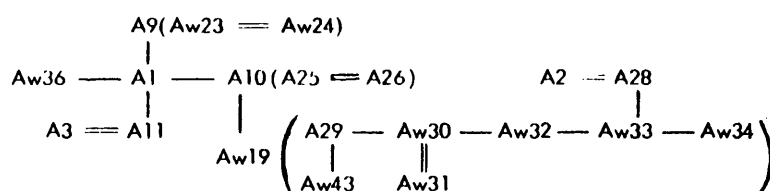
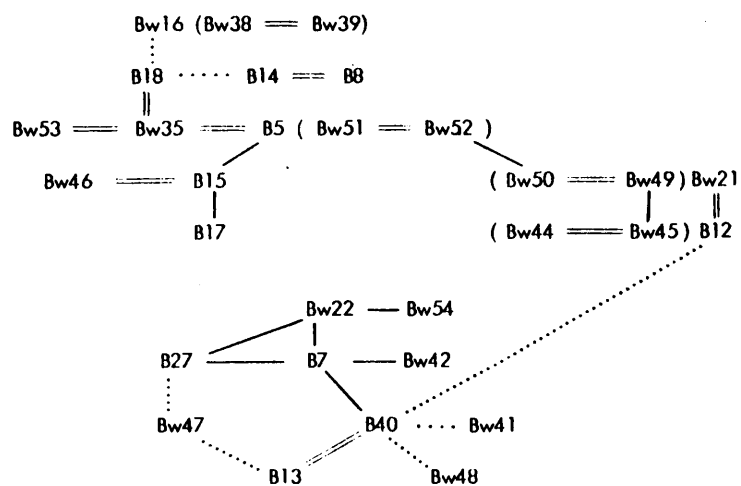
TABLA I.- Nomenclatura aprobada en el VIII "Workshop" de Histocompatibilidad, Los Angeles, 1980.

FRECUENCIAS GENICAS DE LOS ANTIGENOS HLA-A (%)

	CAUCASOIDES (Eur) ^a	NEGROS ^a	ORIENTALES ^a	ESPAÑOLES ^b
A1	14,9	3,3	0,7	12,7
A2	26,0	14,7	25,4	27,4
A3	11,3	8,3	0,6	9,9
A11	5,8	0,7	9,2	7,5
Aw23	2,3	9,6	0,7	4,6
Aw24	9,5	2,8	32,9	6,2
A25	1,9	0,3	0,1	2,4
A26	3,6	3,8	9,2	3,9
A28	4,1	9,0	0,9	3,2
A29	4,1	6,2	0,4	7,6
Aw30	2,7	14,7	0,7	4,6
Aw31	2,6	2,5	7,5	1,3
Aw32	4,5	1,5	0,1	3,5
Aw33	1,6	4,8	7,2	2,7
Aw34	0,5	6,4	0,9	0,0
Aw36	0,3	2,0	0,5	0,0
Blanco	4,2	9,5	3,3	8,7

TABLA II .- Resultados tomados de : a) Estudio de genetica de poblaciones del VIII "Workshop" de Histocompatibilidad, Terasaki et al., 1980.
b) Arnaiz Villena et al., 1981a.

GRUPOS DE REACCION CRUZADA DE LOS ANTIGENOS HLA-A y HLA-B

Antigenos HLA-A :Antigenos HLA-B :

=== Fuerte reaccion cruzada
 — Reaccion cruzada
 Reaccion cruzada ocasional

- Locus HLA-B (Previamente FOUR o SECOND)

Al igual que el locus HLA-A el locus HLA-B es en extremo polimorfo. Contiene más de 30 alelos diferentes. En la Tabla I se relacionan los antígenos HLA-B definidos en la actualidad. Las frecuencias génicas de los antígenos HLA-B también varían dependiendo del grupo étnico considerado, Tabla IV. Como ocurría para el locus HLA-A, en la actualidad se pueden detectar casi la totalidad de los productos codificados por el locus HLA-B.

Los grupos de reacción cruzada característicos de los antígenos HLA-B se muestran en la Tabla III.

- Locus HLA-C (Previamente AJ o THIRD)

Este locus HLA-C, descubierto relativamente hace poco, Sandberg et al., 1970, presenta menos polimorfismo que los anteriores, Tabla I, si bien es verdad que actualmente solo se puede detectar aproximadamente el 50% de los productos codificados en él. Las frecuencias génicas para los alelos del locus HLA-C se muestran en la Tabla V.

Dos antígenos dentro de este locus muestran reacción cruzada, HLA-Cw4 y HLA-Cw6.

- Antígenos HLA-Bw4, Bw6 (HLA-4a, 4b)

Los antígenos 4a, 4b, hoy denominados HLA-Bw4, Bw6, fueron originariamente descritos por van Rood y van Leeuwen (1963) por medio de ensayos de leucoaglutinación y parecían constituir un sistema dialélico. La posterior descripción de los antígenos HLA-B mostró una peculiar, aunque no invariable, relación de estos antígenos con Bw4, Bw6 según se muestra en la Tabla VI.

Por un largo período de tiempo las bases genéticas de las entidades Bw4, Bw6 no fueron entendidas. Algunos investigadores planteaban que los antígenos HLA-B y los antígenos Bw4, Bw6 estuvieran controlados por distintos genes, mientras

FRECUENCIAS GENICAS DE LOS ANTIGENOS HLA- B (%)

	CAUCASIOIDES (Eur) ^a	NEGROS ^a	ORIENTALES ^a	ESPAÑOLES ^b
B7	8,5	8,5	5,5	8,3
B8	8,1	2,1	0,2	5,8
B13	2,7	0,7	2,0	2,0
B14	2,7	4,4	0,3	5,0
B18	5,5	3,8	0,1	7,6
B27	3,9	1,8	0,5	2,0
Bw35	9,5	7,6	7,5	10,8
B37	1,4	0,5	0,6	0,3
Bw38	2,8	0,0	0,3	1,5
Bw39	2,0	1,8	3,0	1,0
Bw41	1,2	1,0	0,4	1,5
Bw42	0,3	7,3	0,7	0,0
Bw44	11,2	7,1	6,4	17,2
Bw45	1,0	4,2	0,2	1,3
Bw47	0,4	0,2	0,2	0,5
Bw48	0,4	1,0	2,1	-
Bw49	2,3	3,0	0,5	2,7
Bw50	1,2	0,7	0,1	3,6
Bw51	7,0	1,6	7,9	6,9
Bw52	1,6	0,8	10,5	2,7
Bw53	0,9	7,1	0,3	0,5
Bw54	0,0	0,0	7,2	-
B17	4,4	14,7	1,8	3,9
Bw22	3,0	0,3	3,9	1,4
B40	5,2	2,0	14,9	1,9
Bw62	5,3	0,7	7,4	3,9
Bw63	0,6	0,3	0,1	0,0
Bw59	0,3	1,0	2,0	-
Blanco	6,9	16,0	14,0	10,2

TABLA IV .- Resultados tomados de : a) Estudio de genetica de poblaciones del VIII "Workshop" de Histocompatibilidad, Terasaki et al., 1980.
b) Arnaiz Villena et al., 1981a.

FRECUENCIAS GENICAS DE LOS ANTIGENOS HLA-C (%)

	CAUCASOIDES (Eur.) ^a	NEGROS ^a	ORIENTALES ^a	ESPAÑOLES ^b
Cw1	4,4	1,0	17,1	2,8
Cw2	5,3	10,7	0,8	6,3
Cw3	10,3	9,1	26,7	6,0
Cw4	12,4	17,0	5,0	12,4
Cw5	6,1	2,5	0,5	8,3
Cw6	9,0	9,1	1,4	-
Blanco	52,6	50,7	48,6	67,6

TABLA V .- Resultados tomados de : a) Estudio de genetica de poblaciones del VIII "Workshop" de Histocompatibilidad, Terasuki et al., 1980.
b) Arnaiz Villena et al., 1981a.

DISTRIBUCION DE LOS ANTIGENOS HLA-B EN Bw4 y Bw6

Bw4 (4a)	Bw6 (4b)
B5 (Bw51 , Bw52)	B18
Bw53	Bw35
B27	B7
B15 (Bw63)	Bw22
B17	Bw42
B12 (Bw44)	Bw54
Bw21 (Bw49)	B15 (Bw62)
B13	Bw46
Bw47	B12 (Bw45)
Bw16 (Bw38)	Bw21 (Bw50)
B37	B40
	Bw41
	Bw48
	Bw16 (Bw39)
	B8
	B14

TABLA VI

que otros pensaban que los sueros anti-HLA-Bw4, Bw6 eran simplemente mezclas de anticuerpos anti-HLA-B; una tercera opinión señalaba que los antígenos Bw4, Bw6 podían ser considerados igual que las especificidades públicas que en el ratón son comunes a varios antígenos H-2K o H-2D.

Confirmando esta última suposición Bernoco et al., 1973 y Ayres y Creswell, 1976 demostraron que los determinantes Bw4, Bw6 son distintos determinantes aunque presentes en la misma molécula que los determinantes HLA-B.

Grumet et al., 1978, estudiando las subdivisiones del antígeno HLA-Bw21 (HLA-Bw49 y HLA-Bw50) asociadas a Bw4 y Bw6, respectivamente, han propuesto que Bw4 y Bw6 representan 2 disposiciones básicas alternativas de la molécula HLA-B, sobre las que se adaptarían los determinantes específicos de la molécula HLA-B.

Estos hechos, sin embargo, no constituyen una evidencia definitiva de la identidad genética entre HLA-B y HLA-Bw4, Bw6, ya que en una misma molécula pueden existir productos de dos genes diferentes.

En este sentido hay que señalar que mientras que la asociación predominante de HLA-Bw44 y HLA-Bw38 en caucasoides es con HLA-Bw4, existen algunos ejemplos en los que esta asociación ocurre con HLA-Bw6 (Wolf y Pritchard, resultados no publicados).

B) ANTIGENOS HLA-D (Determinantes que activan los linfocitos, Lad)

Cuando los linfocitos de dos individuos genéticamente diferentes se mezclan y cultivan "in vitro" (cultivo mixto de linfocitos, MLC) durante algunos días reaccionan de un modo determinado; aumentan de tamaño, su citoplasma aparece lleno de ribosomas y sintetizan gran cantidad de proteínas, RNA y DNA. Esta transformación en blastos es característica de la reacción linfocitaria mixta (MLR) (1), Bain et al., 1964; Bach y Hirschhorn, 1964.

(1) Mixed Lymphocyte Reaction.

Para simplificar el cultivo mixto de linfocitos y hacerlo más práctico se desarrolló el cultivo mixto unidireccional, Bach y Voynow, 1966. En él se utilizan unas células no tratadas como respondedoras y otras tratadas con mitomicina C o irradiadas con rayos X, como estimuladoras. Después del tratamiento las células estimuladoras no sufren estimulación blastica pero son todavía capaces de presentar sus antígenos a las células respondedoras.

Las células estimulantes en cultivo mixto son principalmente linfocitos B y monocitos, mientras que las células respondedoras pertenecen a la subpoblación de los linfocitos T, Møller, 1972; Hansen et al., 1977.

La reacción linfocitaria mixta se debe principalmente al reconocimiento de aloantígenos codificados dentro del Sistema HLA, pero diferentes de los antígenos HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6, Kissmeyer-Nielsen et al., 1970; Dupont et al., 1971; Dupont et al., 1976; Yunis y Amos, 1971.

La explicación más plausible a estos hechos implica la existencia de un locus, el HLA-D, codificando para estos determinantes. Su localización sería próxima al locus HLA-B y fuera del intervalo entre los loci HLA-A y HLA-B.

Los determinantes HLA-D pueden identificarse mediante el empleo de células homocigotas de tipaje (HTC) (1) (Mempel et al., 1973; Thorsby y Piazza, 1975; van den Tweel et al., 1973; Jorgensen et al., 1973). La técnica de tipaje y el análisis estadístico de los resultados que permite la asignación de antígenos se describe más adelante en el apartado Materiales y Métodos.

En la Tabla I se muestran las especificidades HLA-D definidas en la actualidad y en la Tabla VII las frecuencias génicas para cada una de estas especificidades encontradas en algunas poblaciones.

Existen pruebas obtenidas en estudios de familias con recombinantes entre HLA-A y HLA-B que apoyan la existencia de al menos otro locus dentro del Sistema HLA que codifica para determinantes que activan los linfocitos en cultivo mixto, diferencias genéticas para este locus, Lad-2, localizado entre HLA-A y HLA-C, provocan, sin embargo, una reacción linfocitaria mixta rela-

(1) Homozygous Typing Cells.

FRECUENCIAS GENICAS ANTIGENOS HLA-D (%)

	Caucasoides (USA) ^a	Caucasoides (VIII Workshop) ^b
Dw1	6,8	6,9
Dw2	11,7	7,5
Dw3	9,0	8,2
Dw4	5,2	5,3
Dw5	6,1	5,6
Dw6	8,9	10,3
Dw7	9,8	10,3
Dw8	1,6	3,1
Dw9	-	1,4
Dw10	-	2,6
Blanco	40,9	38,8

TABLA VII.- Resultados tomados de a) VII "Workshop" de Histocompatibilidad, Bodmer et al., 1978. b) VIII "Workshop" de Histocompatibilidad, Terasaki et al., 1980.

tivamente débil, Eijssvoogel et al., 1972; Thorsby et al., 1973; Sucio-Foca y Kubistein, 1977.

Los linfocitos aloreactivos en cultivo mixto son claramente heterogéneos y corresponden a distintas subpoblaciones de células, cada una de las cuales reconoce una determinada especificidad (Wilson y Nowell, 1970; Salmon et al., 1971; Zoschke y Bach, 1971). Estas subpoblaciones pueden representar células que "ven" el mismo determinante de un modo diferente, es decir, clones de reacción cruzada, o más probablemente clones que reconocen distintos determinantes (Corley, 1979).

Singal et al., 1980, ha estudiado en condiciones especiales, con números limitantes de linfocitos la frecuencia de estos linfocitos aloreactivos en cultivo mixto, encontrando que 1 de cada 241-486 linfocitos es capaz de reconocer determinantes en los linfocitos de un individuo alogénico no emparentado. Estos mismos autores han señalado que, mediante estas mismas técnicas, pueden ponerse de manifiesto linfocitos aloreactivos contra determinantes no-HLA en el cultivo mixto de linfocitos entre individuos HLA idénticos. La frecuencia de estos linfocitos ha sido estimada de 1 linfocito de cada 995-1.671.

Parece, por tanto, que la reacción linfocitaria mixta se debe al reconocimiento de toda una serie de determinantes alogénicos en la célula estimulante. La intensidad de la respuesta provocada varía de unos determinantes a otros. Los que provocan la estimulación más intensa son los HLA-D y solo en ausencia de estimulación debida a estos determinantes HLA-D se pueden poner de manifiesto otros determinantes más débiles. Algunos de estos determinantes más débiles están codificados fuera del Sistema HLA, Keuning, 1978.

C) ANTIGENOS HLA-DR.

La definición de los antígenos HLA-DR en el hombre estuvo precedida por el descubrimiento de los antígenos Ia en el ratón. El descubrimiento de los antígenos Ia se debió al intento de definir los productos de los genes de la respuesta inmune que en el ratón se localizan en la región IR (equivalente a la región HLA-D en el hombre). Estos antígenos Ia se expresan principalmente en la superfi-

cie de los linfocitos B. Anticuerpos anti-Ia inhiben específicamente la respuesta en cultivo mixto y pueden por lo tanto estar dirigidos contra los determinantes que estimulan en el cultivo mixto (análogos a los determinantes HLA-D humanos) (Götze, 1977).

En un intento de establecer el tipaje serológico de los determinantes HLA-D, van Leeuwen et al., 1973 y van Rood et al., 1975, buscaron y encontraron antisueros capaces de reaccionar específicamente con los linfocitos B y que además inhibían el cultivo mixto de linfocitos.

Estos anticuerpos específicos contra las células B se encontraron en el suero de individuos inmunizados bien por el embarazo o por transfusiones. Aunque en algunas ocasiones los anticuerpos anti-células B aparecían en ausencia de otros anticuerpos anti-HLA-A,-B,-C, normalmente se encontraban acompañados de alguno de estos anticuerpos. Esto hace que previamente haya que absorber estos sueros con "pools" de plaquetas, con objeto de eliminar los anticuerpos anti-HLA-A,-B,-C. Las plaquetas no expresan estos antígenos presentes en los linfocitos B.

Los estudios realizados durante el VII "Workshop" de Histocompatibilidad permitieron la definición de estos antígenos de los linfocitos B y dada la estrecha relación existente entre éstos y los antígenos HLA-D se denominaron HLA-DR (1) (Bodmer et al., 1978).

Aunque en principio fue difícil decidir cuantos loci codificaban para los antígenos HLA-DR, a falta de pruebas en contra, se admite generalmente la existencia de un solo locus, Bodmer et al., 1978. Además, los resultados obtenidos del análisis de familias en este VII "Workshop" de Histocompatibilidad son concordantes con la existencia de un único locus HLA-DR, Lamm et al., 1978.

En la Tabla I se relacionan las especificidades HLA-DR definidas en la actualidad y en la Tabla VIII se muestran las frecuencias génicas de estos alelos en distintos grupos étnicos.

Una de las principales incógnitas en relación a los antígenos HLA-DR es si son los mismos que los antígenos HLA-D definidos por el cultivo mixto. Las primeras pruebas, de que los anticuerpos anti-HLA-DR inhibían específicamente el

(1) DR: D Related.

FRECUENCIAS GENICAS DE LOS ANTIGENOS HLA-DR (%)

	CAUCASOIDES (Eur.) ^a	NEGROS ^a	ORIENTALES ^a	ESPAÑOL ^b
DR1	7,0	6,5	6,0	10,0
DR2	13,1	17,8	20,1	12,7
DR3	10,5	17,8	1,2	9,1
DR4	9,0	5,1	23,5	5,0
DR5	10,2	15,0	2,1	22,3
DRw6	2,1	6,5	4,9	4,8
DR7	12,3	10,8	0,7	23,7
DRw8	4,0	7,9	8,3	1,6
DRw9	-	-	-	1,6
Blanco	31,7	12,7	33,1	11,8

TABLA VIII.- Resultados tomados de : a) Estudio de genetica de poblaciones del VIII "Workshop" de Histocompatibilidad, Terasaki et al., 1980.
b) Arnaiz Villena et al., 1981a.

cultivo mixto de linfocitos, apuntaron hacia una estrecha relación, si no identidad, entre los productos de ambos loci.

El análisis preliminar comparando los antígenos HLA-D asignados en el cultivo mixto de linfocitos y los antígenos HLA-DR definidos serológicamente demostró una correlación muy alta entre ambos antígenos HLA-D y HLA-DR. En función de esta asociación, para la numeración de los antígenos DR se les fue dando el número de los antígenos D con los que mostraban esta estrecha asociación. Así, DR1 correlaciona con Dw1, DR2 con Dw2, etc.

Aunque el análisis posterior de la correlación de los antígenos HLA-D y HLA-DR demostró la existencia de un elevado número de discrepancias, estas fueron consideradas en función de las dificultades técnicas de asignación de antígenos que presentan tanto el tipaje con HTC como la serología HLA-DR. (Bodmer, 1978; Albert y Scholz, 1978). Además, se encontró que la mayor parte de las discrepancias HLA-D/HLA-DR eran del tipo DR+/Dw-, indicando que las especificidades HLA-DR son en cierto modo más amplias que las correspondientes HLA-D.

El estudio de la correlación de los antígenos HLA-D y HLA-DR en diferentes grupos étnicos, que presentan asociaciones diferentes entre antígenos de otros loci, parece necesario a la hora de determinar la identidad o no de los productos HLA-D y HLA-DR. En cualquier caso, un cambio en la correlación de los antígenos HLA-D y HLA-DR podría ser asimismo explicado en función de que ambos determinantes, aunque codificados por loci distintos, se expresen en la misma molécula. Situación análoga a la de los antígenos HLA-B y HLA-Bw4, Bw6.

Sucio-Foca et al., que ya habían presentado pruebas indirectas de la no identidad HLA-D y HLA-DR (Sucio-Foca et al., 1978a) han comunicado recientemente el hallazgo de una familia con un recombinante entre HLA-D y HLA-DR, (Sucio-Foca et al., 1979). La confirmación de este recombinante y el hallazgo de otros indicaría definitivamente que los determinantes HLA-D y HLA-DR son codificados por genes distintos aunque muy estrechamente ligados entre sí.

D) PLT (Test con linfocitos sensibilizados) (1)

A raíz de ciertas observaciones en el ratón (Havry y Anderson, 1975) el ensayo con linfocitos sensibilizados, PLT, fue propuesto como un método alternativo de detección de los productos de la región HLA-D (Sheehy et al., 1975).

El método se basa en la sensibilización de los linfocitos en un cultivo mixto primario frente a determinados determinantes HLA-D, esta sensibilización se traduce en una respuesta específica acelerada en el tiempo y más intensa hacia los determinantes utilizadas en la sensibilización, cuando los linfocitos sensibilizados se reestiman en un cultivo mixto secundario (PLT).

Se ha observado que esta sensibilización puede generar respuesta en el cultivo secundario hacia determinantes HLA-D, determinantes HLA-no D, e incluso hacia determinantes no HLA (Rubinstein y Sucio-Foca, 1977; Sucio-Foca et al., 1977).

Parece, sin embargo, que los determinantes detectados en cultivo secundario, determinantes PLT corresponden principalmente a la región HLA-D/DR del Sistema HLA (Mawás et al., 1975; Bradley et al., 1976).

Se han encontrado pruebas a favor de que estos determinantes detectados por PLT sean los determinantes HLA-D (Bradley et al., 1978), los determinantes HLA-DR (Sasportes et al., 1978a; Sucio-Foca et al., 1979) o entidades denominadas como "determinantes PL" diferentes de HLA-D y HLA-DR (Nuñez Roldan et al., 1978; Sasportes et al., 1978b; Termijtelen et al., 1980) pero localizados en esta misma región HLA-D/DR.

Recientemente se han presentado pruebas a favor de una nueva serie de antígenos de histocompatibilidad designados como antígenos SB. Estos antígenos que provocan una respuesta débil en el cultivo mixto de linfocitos primario, generan, sin embargo, una respuesta fuerte en cultivo secundario. Se localizan dentro del Sistema HLA, posiblemente dentro de la región HLA-D/DR, y aunque distintos guardan una estrecha relación con los antígenos HLA-D y HLA-DR (Shaw et al., 1980).

(1) Primed Lymphocyte Test.

E) ASPECTOS MOLECULARES DE LOS ANTIGENOS HLA.

La estructura molecular de los antígenos HLA-A, -B, -C y -DR se muestra en la Figura 1. Los productos génicos de los loci HLA-A, -B, -C son polipeptidos glicosilados de peso molecular alrededor de 43.000 que penetran la membrana plasmática de modo que el -COOH terminal queda expuesto hacia el citoplasma celular. Estos polipeptidos glicosilados están unidos no covalentemente a otro polipeptido no glicosilado de peso molecular 12.000 que es idéntico a la β_2 -microglobulina de orina. Este último polipeptido no contribuye a la actividad aloantigénica y probablemente no penetra la bicapa lipídica, de modo que su asociación a la membrana está por completo mediada por la interacción con la cadena pesada (Crumpton et al., 1978). La β_2 -microglobulina está codificada por un gen en el cromosoma humano número 15 (Goodfellow et al., 1975).

Recientemente se ha demostrado que los mRNAs que codifican para las cadenas pesadas HLA-A y HLA-B pueden ser traducidos "in vitro" originando productos que presentan fragmentos adicionales en su extremo -NH₂ terminal (20-24 residuos). Si se añaden microsomas durante la traducción, estos productos atraviesan la membrana microsomal y son procesados, proceso que probablemente consiste en la eliminación del fragmento-NH₂ terminal y la glicosilación de la cadena pesada (Ploegh et al., 1979).

Estas cadenas pesadas HLA-A y HLA-B inmediatamente después de su síntesis no están, o lo están en muy pequeña proporción, asociadas a β_2 -microglobulina. Esta asociación ocurre, para la línea celular T5-1, en los 15 minutos siguientes aproximadamente y provoca un cambio conformacional en la molécula que hace aparecer el determinante aloantigénico e induce la modificación del oligosacárido inicial al permitir la acción de sistemas enzimáticos que lo transforman en el oligosacárido complejo característico de los antígenos HLA.

La asociación de β_2 -microglobulina con la cadena pesada, parece ser también un requerimiento para que se produzca el movimiento de la cadena pesada hacia la superficie celular (Kraegel et al., 1979).

MODELOS DE LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE LOS
ANTIGENOS HLA-A, -B, -C Y -DR.

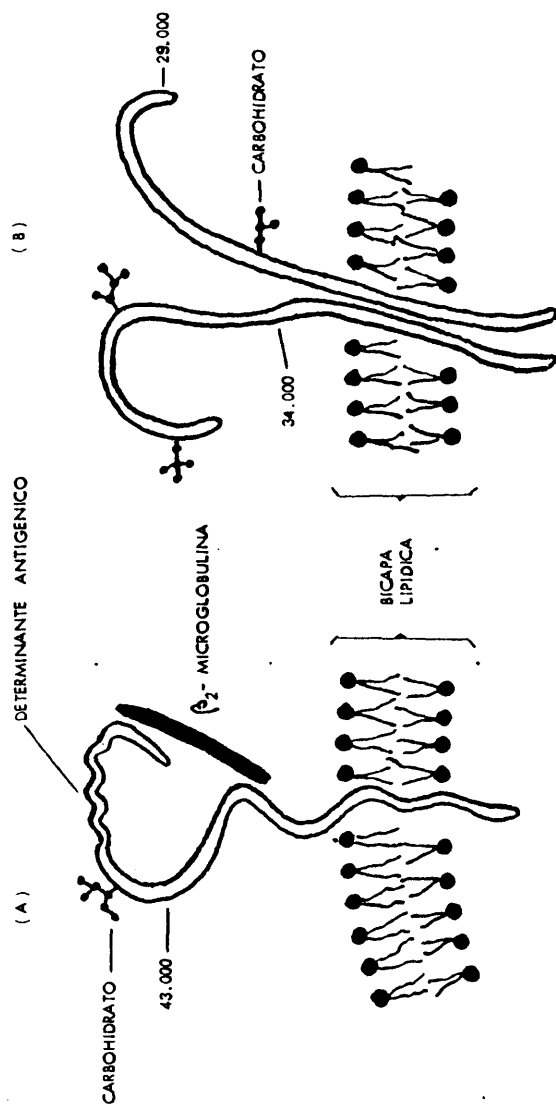


FIGURA 1.- Modelos de la estructura de (A) Antigenos HLA-A, -B, -C y (B) HLA-DR.
Basados en Crumpton et al., 1978.

En este sentido se ha comprobado que las células Daudi, que presentan un déficit del gen que codifica para β_2 -microglobulina, son capaces de sintetizar cadenas pesadas HLA-A y HLA-B y que estos productos permanecen constantemente en el interior celular, no detectándose en su superficie (Ploegh et al., 1979).

Entre 60 y 80 minutos después de su síntesis los antígenos HLA-A y HLA-B de la línea celular T5-1 pueden ser detectados en la superficie celular (Krange et al., 1979).

Ya que la retirada del carbohidrato de la molécula HLA no produce ningún cambio en la antigenicidad y que la desnaturalización de la proteína destruye esta actividad antigénica, se considera que los determinantes antigénicos residen en la cadena polipeptídica.

El oligosacárido de, aproximadamente 3.000 de peso molecular, está unido a un residuo de Asparagina aproximadamente a 100 residuos del $-\text{NH}_2$ terminal (Parham et al., 1977).

La estructura similar de los productos genicos de los loci HLA-A, -B, -C y su asociación común con β_2 -microglobulina claramente señalan que han debido surgir por duplicación génica. Algunas pruebas preliminares sugieren que los antígenos HLA-C se parecen más a los antígenos HLA-A que a los antígenos HLA-B, a pesar de que el locus HLA-C está más próximo al locus HLA-B que al locus HLA-A. Los antígenos HLA-C se expresan aparentemente en mucha menor cantidad que los HLA-A o HLA-B (Snary et al., 1977).

Aunque β_2 -microglobulina muestra una marcada homología con el dominio CH3 de la inmunoglobulina G (Cunningham y Berggard, 1974), no existen pruebas claras que apoyen el postulado origen común entre inmunoglobulinas y antígenos HLA-A, -B, -C (Bodmer, 1972; Gally y Edelman, 1972). Parece por tanto que la respuesta definitiva a esta cuestión debe esperar a la determinación completa de las secuencias de aminoácidos de los productos de los loci HLA-A, -B, -C así como a la localización exacta de la situación de los puentes disulfuro intracatenarios (Crumpton et al., 1978).

Los antígenos HLA-DR están formados por dos cadenas glicoproteicas diferentes de pesos moleculares 29.000 y 34.000 asociadas no covalentemente para formar un complejo muy compacto (Strominger et al., 1980). Ambas cadenas atraviesan la membrana de manera que presentan un fragmento muy grande, que corresponde al extremo $-NH_2$ terminal, hacia el exterior celular, un pequeño fragmento hidrofóbico insertado en la membrana y otro pequeño fragmento correspondiente al $-COOH$ terminal hacia el interior celular (Walsh y Crumpton, 1977). Este extremo $-COOH$ terminal en la cadena pesada se encuentra fosforilado (Kaufman y Strominger, 1979), pudiendo estar el complejo debilmente asociado con otras proteínas intracelulares.

El contenido de carbohidratos de las dos cadenas parece diferente, la cadena pesada lleva dos cadenas de oligosacaridos y la ligera una sola. Se desconoce la posición exacta de los carbohidratos en la molecula (Korman et al., 1980).

Ambas cadenas pueden sintetizarse "in vitro" en un sistema de traducción de mRNAs libre de células. En estas condiciones los precursores de ambas cadenas parecen poseer prolongaciones en sus extremos $-NH_2$ terminales. Cuando se añaden microsomas a este sistema "in vitro", se produce la rotura de la cadena polipeptídica, la incorporación del carbohidrato y la secreción de las dos cadenas en las vesículas microsomales. Ambas cadenas no parecen ser traducidas como una poliproteína que después de su síntesis sufriera rotura endoproteica originando las dos cadenas que constituyen la molecula HLA-DR. Por tanto, ambas cadenas, pesada y ligera, de la molecula HLA-DR parecen originarse a partir de mRNAs diferentes (Korman et al., 1980).

Se ha demostrado que el polimorfismo de los antígenos HLA-DR no reside exclusivamente en la parte carbohidratada de la molecula (Fuks et al., 1977).

Aunque estudios realizados en células somáticas híbridas entre hombre y ratón han mostrado que solo la cadena pesada está codificada dentro del Sistema HLA y que esta cadena sería, por tanto, la responsable del polimorfismo detectado por los aloantisueros anti-HLA-DR (Barnstable et al., 1978), se han presentado pruebas que, por el contrario, muestran que las cadenas pesadas de diferentes aloespecificidades HLA-DR son virtualmente idénticas en todas las líneas celulares estudiadas.

y que las cadenas ligeras de estas aloespecificidades HLA-DR al ser diferentes, deben, por tanto, llevar el determinante aloantígeno (Kaufman et al., 1980).

En la Figura 1 se muestra un modelo simplificado de la estructura molecular de los antígenos HLA-DR. Se ha omitido en esta representación la localización de los determinantes aloantigenicos, debido a la contradicción existente entre los resultados experimentales comentados anteriormente.

F) OTROS GENES DENTRO DEL SISTEMA HLA.

- Genes de la respuesta inmune.

El complejo principal de histocompatibilidad de mamíferos, incluidos el ratón y el mono, controla específicamente la respuesta a determinados antígenos por medio de los llamados genes de la respuesta inmune (I_r en el ratón) (Benacerraf, 1974; Benacerraf y Germain, 1978; Green, 1974; Klein, 1975; McDevitt y Benacerraf, 1969).

Dada la gran homología entre el Sistema HLA (Complejo Principal de Histocompatibilidad en el hombre) y los correspondientes sistemas en estos animales, es de suponer que también en el hombre existan genes de la respuesta inmune y que estos genes estén codificados dentro del Sistema HLA. En la actualidad existen algunas pruebas en favor de estos hechos:

- 1.- La capacidad para desarrollar anticuerpos IgE hacia el antígeno E de "Rag-weed" parece que se hereda con determinados haplotipos HLA (Blumenthal et al., 1974).
- 2.- El Sistema HLA parece controlar la formación de anticuerpos contra el Factor VIII de la coagulación en hemofílicos (Nuñez Roldan et al., 1979)
- 3.- Complicados análisis estadísticos del título de determinados anticuerpos en familias indican que el Sistema HLA influencia la producción de anticuerpos hacia varios antígenos (Buckley et al., 1973).

En otro sentido, el hecho de que la mayor parte de las enfermedades asociadas a antígenos HLA lo estén preferentemente a antígenos codificados por la región HLA-DR \leftrightarrow HLA-B sugiere que la localización de los genes de la respuesta inmune en el hombre sea entre estos loci.

- Genes que codifican para componentes del complemento.

La primera indicación de que el complemento estaba de algún modo controlado por el Sistema Principal de Histocompatibilidad se encontró en el ratón cuando Demant et al., 1973, demostraron que la sustancia serica, Ss, que previamente se había encontrado estaba codificada en el Sistema H-2 (equivalente al Sistema HLA en el hombre), era un componente del complemento del ratón. Posteriormente se demostró que se trataba del C4 (Lachmann et al., 1975).

Allen, 1974, demostró que el polimorfismo del Factor B, Bf, descrito por Alper et al., 1972, estaba ligado al HLA.

El locus Bf está probablemente situado entre HLA-B y HLA-D (Hauptmann et al., 1976a; Raum et al., 1976; Schreuder, 1979). Contiene, al menos, 6 diferentes alelos funcionalmente idénticos. BfF y BfS son los más comunes. BfF1 y BfS1 son menos frecuentes y BfF0,55 y BfS0,8 son extremadamente raros (Alper et al., 1972; Hauptmann et al., 1976b; Hauptmann et al., 1977).

Las frecuencias génicas de los alelos del Factor B son diferentes en los distintos grupos étnicos, Tabla IX.

Teisberg et al., 1977, han demostrado el ligamiento de los alotipos del C4 con antígenos HLA y han encontrado que en los recombinantes estudiados entre HLA-B y HLA-A y entre HLA-B y HLA-C los alotipos del C4 segregan con el locus HLA-B. Hace poco, Rittner et al., 1979, estudiando un recombinante HLA-B/HLA-D han encontrado que en este caso el C4 segregaba con el fragmento HLA-D.

Recientemente O'Neill et al., 1978, han demostrado que los antígenos eritrocitarios humanos, Chido y Rodgers, son probablemente idénticos a dos tipos diferentes del componente del complemento C4. Han encontrado que los individuos

FRECUENCIAS GENICAS DE LOS ALELOS DEL FACTOR B (Bf)

	BfS	BfF	BfF1	BfS1	Otros
CAUCASOIDES (USA) ^a	0,709	0,278	-	0,013	-
CUACASOIDES (Europeas) ^b	0,808	0,174	0,007	0,009	0,0004
" ^c	0,813	0,160	0,006	0,020	-
SUIZOS ^d	0,805	0,176	0,010	0,019	-
ITALIANOS ^d	0,718	0,250	0,008	0,024	-
NEGROS (USA) ^a	0,437	0,512	0,051	-	-
NEGROS (Sudafricanos) ^e	0,282	0,655	0,035	0,026	-
JAPONESES ^f	0,824	0,176	-	-	-
ORIENTALES (USA) ^a	0,890	0,110	-	-	-
ESPAÑOLES ^g	0,658	0,266	0,052	0,022	-
VASCOSES ^g	0,562	0,270	0,145	0,020	-

TABLA IX. - a) Alper et al., 1972; b) Mauff et al., 1975; c) Bender et al., 1977; d) Scherz et al., 1977; e) Mauff et al., 1976; f) Horai, 1976; g) Rodriguez de Cordoba et al., 1981.

que no poseen el tipo electroforetico C4S son siempre Rodgers negativos y los que no tienen el tipo electroforetico C4F son siempre Chido negativos, además, aquellos individuos deficientes de C4 son, asimismo, Chido y Rodgers negativos. Como prueba final han encontrado que C4F o C4S purificados inhiben específicamente los antisueros anti-Chido o anti-Rodgers, respectivamente. Ya que no existe alelismo entre los genes Chido y Rodgers, probablemente existen dos genes dentro del Sistema HLA que codifican para C4.

C2 también presenta polimorfismo y sus alelos muestran asociación a determinados antígenos HLA (Alper, 1976; Hobard y Lachmann, 1976; Meo et al., 1976). La deficiencia de C2 presenta además una fuerte asociación a un determinado haplotipo HLA: A25, B18, BfS, Dw2.

La localización del locus que codifica para C2 parece próxima a la del locus que codifica para C4 (Olaisen et al., 1978).

Parece, por tanto, que la localización en el Sistema HLA de los genes que codifican para Factor B, C2 y C4 es muy similar y que estaría entre HLA-D y HLA-B.

El estudio de una familia con un individuo deficiente de C8 indicó que esta deficiencia estaba ligada al Sistema HLA, Merrit et al., 1976. Aunque este hecho no ha sido confirmado en otras tres familias con individuos deficientes de C8, ya que el C8 está constituido por tres cadenas polipeptídicas diferentes, pudieran ser que la deficiencia de C8 en estas familias tuviera como razón la falta de uno u otro polipeptido, estando solo uno de ellos codificado en el Sistema HLA.

Los componentes del complemento C3, C5, C6, C7, C1r, C1 inhibidor y C3b inactivador no están codificados en el Sistema HLA (Referencias en Lachmann y Hobart, 1978). Recientemente se ha encontrado que el C1q tampoco está ligado al Sistema HLA (Arnaiz Villena et al., 1981b).

- Otros genes

Glioxalasa I (GLO).

Este enzima eritrocitario, de función desconocida en el hombre, presenta polimorfismo genético con dos alelos, GLO-F y GLO-S, distinguibles por sus diferentes movilidades electroforéticas. El locus que codifica para GLO se encuentra fuera

del Sistema HLA a 7,5 centimorgans del locus HLA-DR en dirección al centrómero (López Larrea et al., 1981).

Fosfoglucomutasa 3 (PGM3)

Más alejado y en dirección al centrómero se localiza el locus que codifica para PGM3 (Lamm et al., 1972).

Receptores C3d.

Los receptores para C3d están ligados al Sistema HLA y codificados en el cromosoma 6 humano (Arnaiz Villena y Festenstein, 1975; Curry et al., 1976).

G) LOCALIZACION CROMOSOMICA DEL SISTEMA HLA; ORDENAMIENTO DE LOCI DENTRO DEL SISTEMA HLA.

Mediante técnicas de hibridación somática, van Someren et al., 1974, asignaron el Sistema HLA al cromosoma humano número 6. Más recientemente Francke y Pellegrino, 1977, también mediante técnicas de hibridación somática, lo localizaron más precisamente en el brazo corto de este cromosoma 6.

En 1978, Human Gene Mapping 4, el Sistema HLA fue localizado entre 6p21 y 6p23.

En la actualidad, Berger et al., 1979, y Ferrando et al., 1981, han aportado evidencias que permiten acortar aún más este fragmento localizando el Sistema HLA entre 6p22.4 y 6p21.05.

Como se ha venido comentando el análisis de familias desde que comenzó el estudio del Sistema HLA ha posibilitado la detección de toda una serie de recombinantes intra-HLA, que junto con la detección de anomalías cromosómicas y estudios de hibridación somática han permitido localizar y ordenar los loci dentro del Sistema HLA. La Figura II muestra un esquema simplificado de la ordenación y localización en el brazo corto del cromosoma 6 humano de los loci que se han ido mencionando.

ORDENAMIENTO DEL LOCI DENTRO DEL SISTEMA HLA

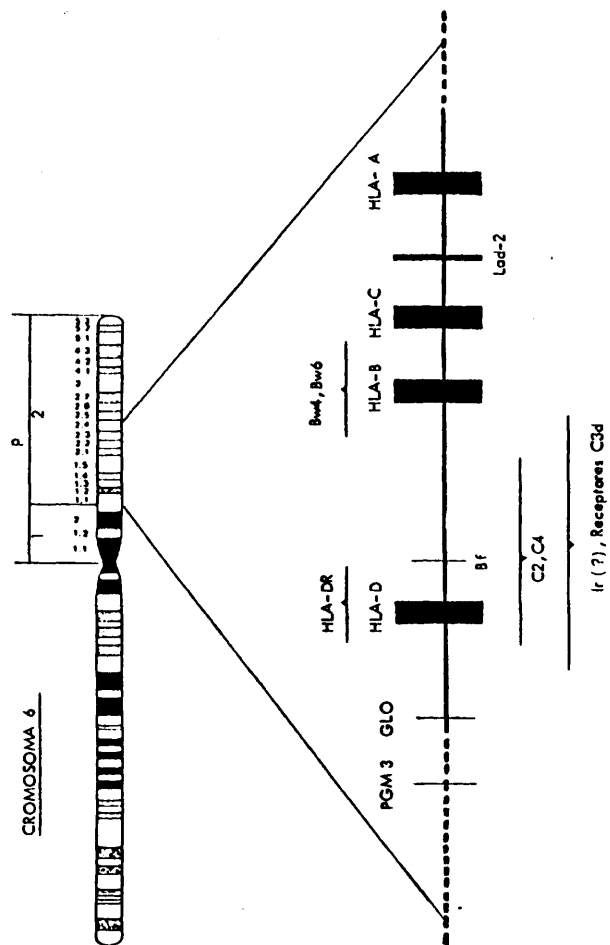


FIGURA 11

H) RELACIONES ENTRE LOS LOCI DEL SISTEMA HLA; DESEQUILIBRIOS DE LIGAMIENTO, GENETICA DE POBLACIONES.

Dada la proximidad entre los loci del Sistema HLA, estos genes normalmente se transmiten en bloque. Cada individuo, por tanto, transmitirá a su descendencia dos bloques ("haplotipos") diferentes, cada uno correspondiente a los genes contenidos en uno solo de los dos cromosomas autólogos.

La frecuencia de recombinación dentro del Sistema HLA se estima en un 1% (Sveejaard et al., 1971), es decir, uno de cada 100 meiosis aportaría un nuevo haplotipo resultante del sobrecruzamiento en la región del Sistema HLA de los dos cromosomas autólogos. La posibilidad de que esta recombinación se produzca entre dos determinados loci HLA depende, por supuesto, de la distancia existente entre ambos.

Assumiendo que estos loci pueden separarse por recombinación, como ya ha sido observado para la mayor parte de ellos, y que desde su origen el número de recombinaciones que han ocurrido en el Sistema HLA ha tenido que ser suficiente para separarlos, uno debe esperar que los alelos de dos loci próximos se comporten como caracteres independientes entre sí.

Sin embargo, llama la atención que dentro del Sistema HLA determinados alelos de loci distintos muestran una asociación preferencial entre sí. Esta asociación preferencial se traduce en que determinadas parejas de alelos aparezcan en un mismo haplotipo con mayor frecuencia de lo que cabría esperarse de las frecuencias génicas individuales de cada uno de los alelos. Este fenómeno se conoce como desequilibrio de ligamiento (Mattiuz et al., 1970) y puede ser cuantificado como Δ ; donde Δ_{AB} (desequilibrio de ligamiento entre dos alelos A y B de loci distintos) es la diferencia entre la frecuencia haplotípica observada, H_{AB} , y la frecuencia haplotípica esperada, calculada a partir de las frecuencias génicas individuales de los alelos A y B ($p_A \times p_B$), según:

$$\Delta_{AB} = H_{AB} - p_A \times p_B$$

Analizando la distribución de los valores de Δ positivos y Δ negativos se observa que las desviaciones positivas son más pronunciadas que las negativas, lo que parece indicar que estas desviaciones negativas son secundarias a las positivas.

Hay que resaltar que al igual que ocurría con las frecuencias individuales de cada alelo para cada loci del Sistema HLA, las asociaciones entre alelos y la intensidad del desequilibrio de ligamiento son características de cada población. Tabla X.

La explicación de la existencia de desequilibrio de ligamiento en el Sistema HLA ha estado sometida a discusión considerable. Ya que no parece probable que el desequilibrio de ligamiento se deba exclusivamente a deriva genética por azar. Bodmer et al., 1972, 1978, han concluido que la selección natural ha debido contribuir al origen y mantenimiento de estos desequilibrios de ligamiento. El punto en el que determinadas combinaciones pudieran resultar más beneficiosas que otras para su portador permanece poco claro y solo a medida que vayan dilucidándose el papel biológico real de este sistema podrá establecerse la importancia que la selección natural ha tenido en relación al desequilibrio de ligamiento existente entre alelos de loci distintos en el Sistema HLA.

Por otro lado, Degos y Dausset, 1974, en base a las diferencias encontradas entre las frecuencias de algunos haplotipos en distintas poblaciones han sugerido que el desequilibrio de ligamiento podría tener su origen en la mezcla de poblaciones producida por las diferentes migraciones.

Lo más probable es que los tres mecanismos mencionados, deriva genética, selección natural y mezcla de poblaciones hayan contribuido a establecer los desequilibrios de ligamiento existentes, aunque la contribución relativa de cada uno de ellos sea desconocida.

El elevado polimorfismo del Sistema HLA, donde la combinación de los alelos de todos los loci entre sí permite un número elevadísimo (varios millones) de combinaciones diferentes, hace que la posibilidad de identidad entre dos individuos no relacionados para todos los loci sea en extremo baja.

DESEQUILIBRIOS DE LIGAMIENTO EN LA POBLACION ESPAÑOLA

HAPLOTIPO	$\Delta(\times 1000)$	H	χ^2
A1-B8	33	40	72 ***
A1-B17	12	17	11 ***
A3-B7	16	23	13 ***
A11-Bw22	9	10	28 ***
A11-Bw27	5	6	7 **
A11-Bw35	9	17	4 *
Aw23-Bw49	5	6	6 *
A25-Bw62	5	6	9 **
A26-Bw38	6	7	20 ***
A28-Bw49	5	6	11 ***
A29-Bw44	40	53	63 ***
A29-Bw45	5	6	10 **
Aw30-B18	15	18	28 ***
Aw30-B13	9	10	33 ***
Aw32-B27	3	4	5 *
Aw33-B14	20	21	130 ***
Cw1-B27	9,4	10	62 ***
Cw2-B27	9,3	11	28 ***
Cw2-B40	6	7	11 ***
Cw2-Bw47	2,8	3	7 **
Cw3-Bw62	27	30	149 ***
Cw3-B22	10	11	48 ***
Cw3-B40	11	12	42 ***
Cw4-Bw35	93	106	363 ***
Cw5-Bw44	21	35	14 ***
Cw5-B18	31	38	76 ***
DR2-Bw51	33	44	5 *
DR2-B7	30	38	5 *
DR5-B40	41	56	7 **
DRw6-Bw38	14	16	4 *

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

TABLA X.- Tomado de Amaiz Villena et al., 1981a.

De ahí que el grado de parentesco entre individuos pueda ser estimado en función de la mayor o menor identidad HLA. Si, además, añadimos el hecho de que determinadas combinaciones de alelos están en desequilibrio de ligamiento y que estos desequilibrios de ligamiento son característicos de la población estudiada, puede entenderse porqué el Sistema HLA es en la actualidad la mejor herramienta de que disponemos para estudiar las relaciones existentes entre las distintas poblaciones.

1) EVOLUCION DEL SISTEMA HLA.

Se ha sugerido a menudo que los genes del Sistema HLA y del Sistema H-2 se han originado por una serie de duplicaciones génicas. Barnstable et al. 1978, han aportado datos bioquímicos y de secuencia que permiten suponer que al menos HLA-A, HLA-B y HLA-C se han originado a partir de un ancestro común por duplicación. Del mismo modo (Lachmann y Hobart, 1978a), C2 y Factor B están codificados por dos loci estrechamente ligados situados entre los loci HLA-B y HLA-D y son claramente productos homólogos que han tenido que originarse a partir de genes duplicados.

No parece existir relación entre ambos productos; antígenos HLA-A, -C, -B y factores de complemento, entre sí o con los productos de la región HLA-D/DR.

Esta región HLA-D/DR, sin embargo, parece estar constituida por toda una serie de loci estrechamente ligados y por su parte también podrían haberse originado por duplicación génica de un ancestro común.

La homología funcional entre productos del Sistema HLA parece ser mayor que su homología en términos de evolución molecular si, como se ha sugerido por Barnstable et al., 1977, los productos HLA-A, -B, -C y -D/DR realizan todos ellos funciones en la superficie celular similares a las del complemento.

Parece, por tanto, posible que la organización general del material genético en organismos superiores incluya el agrupamiento de secuencias génicas duplicadas, como es el caso del Sistema HLA. Pudiera ser entonces que estos

agrupamientos fueran las unidades genéticas funcionales básicas, cada una de las cuales está involucrada en toda una serie de funciones estrechamente relacionadas. (Bodmer y Bodmer, 1978).

3.- IMPLICACIONES EN EL TRANSPLANTE.

Los antígenos de histocompatibilidad son los responsables del rechazo de injertos. En todas las especies suficientemente estudiadas se ha encontrado que existe un gran número de sistemas genéticos, no asociados entre sí, que codifican para antígenos de histocompatibilidad (H). Las diferencias para algunos de estos antígenos entre el donante y el receptor provocan un rechazo débil (o prolongado) del injerto, mientras que diferencias para otros antígenos llevan a un rechazo fuerte (o rápido); estas diferencias nos permiten distinguir entre Sistemas de Histocompatibilidad débiles o fuertes.

El Sistema HLA es el Sistema Principal (más fuerte) de Histocompatibilidad en el hombre, Ceppellini et al., 1969, del mismo modo que el Sistema H-2 lo es en el ratón y el Sistema RT-1 lo es en la rata.

A) TRANSPLANTE RENAL

Sakai y Simonsen, 1969, y Bildsoe et al., 1970, trabajando en rata demostraron que de cara al trasplante renal, el Complejo Principal de Histocompatibilidad (Sistema RT-1) no solo era el principal responsable del rechazo del injerto, sino que era el único.

En el hombre, estos hechos se han conocido por otro camino. A medida que se fueron realizando trasplantes de donantes vivos entre miembros de la misma familia, de padres a hijos o entre hermanos, se ha ido viendo que también existía un sistema genético, el Sistema HLA, que era importante para la supervivencia del injerto. Y ya que el éxito del trasplante estaba directamente relacionado con la compatibilidad HLA, se razonó que los genes que provocaban el rechazo del

injerto y aquellos que codificaban para los antígenos detectados en el laboratorio deberían ser parte del mismo sistema genético.

Singal et al., 1969, demostraron que los transplantes de vivo entre individuos HLA idénticos eran los que mejor salían, que los realizados entre individuos HLA diferentes eran los peores y que los transplantes entre individuos haplo idénticos lo hacían de un modo intermedio.

Estos resultados, sin embargo, fueron menos dramáticos cuando se empezaron a transplantar riñones entre individuos no emparentados y aunque fue evidente que la supervivencia era mejor a mayor compatibilidad HLA, cuando se transplantaban riñones entre individuos no relacionados HLA-A,-B,-C,-DR idénticos esta supervivencia era menor que la que se daba con individuos emparentados HLA idénticos.

La importancia relativa de los antígenos HLA codificados por los loci HLA-A,-B y -DR de cara a la supervivencia del trasplante ha sido investigada y no parece ser la misma. (Moen et al., 1980a; Festenstein et al., 1976; Opelz y Terasaki, 1980; France Transplant, 1980).

La supervivencia aumenta a mayor compatibilidad HLA-DR, y en cualquier caso van mejor aquellos transplantes en los que no existen incompatibilidades HLA-DR. La importancia del locus HLA-B parece mayor que la del locus HLA-A. La compatibilidad para estos loci HLA-A y HLA-B, o al menos la menor incompatibilidad posible, parece importante en el caso de existir incompatibilidades HLA-DR.

El efecto de los loci HLA-A y HLA-B (Opelz y Terasaki, 1980; France Transplant, 1980) y del locus HLA-DR (Opelz y Terasaki, 1980) sobre la supervivencia del trasplante, parece minimizado por el número de transfusiones que previamente al trasplante haya recibido el receptor. Aunque este punto al menos en lo que respecta al locus HLA-DR es actualmente discutido por otros autores (Moen et al., 1980b) que apuntan un papel beneficioso de las transfusiones solo en el caso de existir incompatibilidades HLA-DR, no parece aconsejable una terapia de transfusiones previas al trasplante, ya que ello suele llevar consigo la aparición de anticuerpos citotóxicos en el receptor y podrían dificultar enormemente la oportunidad de trasplante para estos individuos politransfundidos.

B) TRANSPLANTE DE MEDULA OSEA

De cara al transplante de médula osea la compatibilidad para el locus HLA-D parece de trascendental importancia, incluso existiendo diferencias para alguno de los antígenos HLA-A o HLA-B. Parece que la compatibilidad HLA-D (Cultivo mixto de linfocitos negativo del donante hacia el receptor) es el requisito principal para evitar la reacción del injerto frente al huesped, GVH (1), O'Reilly et al., 1977.

4.- SISTEMA HLA Y ENFERMEDAD. (Para referencias veanse las revisiones: Dausset, 1978; Dausset y Svejgaard, 1978; Ryder y Svejgaard, 1976; Terasaki et al., 1980).

El descubrimiento del polimorfismo eritrocitario animó a la búsqueda de asociación de estos marcadores genéticos con enfermedades, pero, a pesar del esfuerzo empleado, los resultados fueron limitados. Se han confirmado, sin embargo, algunas asociaciones como la de la ulcera de duodeno con el grupo sanguíneo O o la del cancer de estomago con el grupo A.

Basados en las observaciones hechas en el ratón de que la susceptibilidad a determinados virus estaba asociada a antígenos codificados en el Complejo Principal de Histocompatibilidad (Lilly et al., 1964), se abordaron estudios análogos en el hombre. Como resultado de esa búsqueda se ha encontrado que una serie de enfermedades están indiscutiblemente asociadas a la presencia de determinados antígenos de histocompatibilidad (Dausset y Svejgaard, 1977; Dausset, 1978; Terasaki et al., 1980):

Enfermedades asociadas al locus HLA-A (Referencias al comienzo de este apartado).

Hasta la fecha la única enfermedad fuertemente asociada a un antígeno del locus HLA-A es la hemocromatosis idiopática, enfermedad familiar del metabolismo del hierro, está asociada al antígeno HLA-A3. El 80% de los enfermos que padecen esta enfermedad son HLA-A3 positivos, mientras que solo el 20% de los indivi-

(1) Graf Versus Host.

duos sanos presenta este antígeno. En los enfermos con hemocromatosis idiopática este antígeno HLA-A3 se encuentra preferentemente formando parte de los haplotipos A3—B7 y A3—B14, o solo A3—B7, dependiendo de las poblaciones. Esto hace que B7 y B14, o solo B7, estén también asociados significativamente a la enfermedad, aunque de un modo secundario, en estas poblaciones.

Se ha encontrado un exceso de algunos antígenos HLA-A en otras enfermedades como aplasia medular idiopática (HLA-A2) o leucemia aguda linfoblástica (HLA-A2).

Enfermedades asociadas al locus HLA-B (Referencias al comienzo de este apartado).

La espondilitis anquilosante, enfermedad raramente familiar que afecta principalmente a los hombres, está asociada fuertemente al antígeno HLA-B27. El 90% de los individuos que padecen esta enfermedad son HLA-B27 positivos, mientras que la frecuencia de este antígeno en la población normal oscila entre 5-10%. HLA-B27 aparece frecuentemente formando parte de dos haplotipos, B27—Cw1 y B27—Cw2. De ahí, que Cw1 y Cw2 estén aumentados también en la población enferma. Este aumento de Cw1 y Cw2 es secundario al de B27 (Arnaiz Villena et al., 1980b).

La asociación entre HLA-B27 y espondilitis anquilosante se ha encontrado en todas las poblaciones estudiadas.

Otras enfermedades articulares que están, asimismo, asociadas al antígeno HLA-B27 son: Síndrome de Reiter, Artritis Reumatoide Juvenil, Sacroileitis, etc.

La tireoiditis subaguda, o enfermedad de Quervain, está asociada a HLA-Bw35. El 75% de los enfermos con esta enfermedad de Du Quervain son Bw35 positivos mientras que solo el 20% de los individuos normales presentan este antígeno. No se ha encontrado asociación de ningún alelo de otro locus con esta enfermedad.

La enfermedad de Behcet está asociada a HLA-B5.

Enfermedades asociadas al locus HLA-C (Referencias al comienzo de este apartado).

La psoriasis vulgaris se encuentra asociada a un antígeno HLA-C, el Cw6. Las

asociaciones encontradas previamente a la definición de Cw6 entre B13, B17 o Bw39 con esta enfermedad son seguramente debidas al desequilibrio de ligamiento entre estos antígenos del locus HLA-B y Cw6.

Enfermedades asociadas a la región HLA-D/DR. (Ref. al comienzo de este apartado).

Toda una serie de enfermedades de tipo autoinmune: miastemia gravis, enfermedad de Addison, enfermedad de Sjögren, hepatitis activa crónica y otras, pueden agruparse en función de su asociación a B8, DR3 y Dw3.

La diabetes mellitus insulín dependiente que muestra, asimismo, una asociación a B8, DR3 y Dw3 está asociada también a los antígenos Cw3, B15, DR4 y Dw4 (principalmente en el norte y centro de Europa) y a Cw5, B18 y BfF1, en España, Sur de Francia y Cerdeña.

La esclerosis múltiple está asociada a A3, B7 y DR2, en caucasoides europeos, y no en poblaciones mediterráneas (italianos) o en judíos.

La asociación encontrada entre antígenos de los loci HLA-A y HLA-B con estas enfermedades es secundaria a la asociación de la enfermedad con los antígenos HLA-D/DR.

B8, DR3, Dw3; Cw3, B15, DR4, Dw4; Cw5, B18, BfF1, DR3; y A2, B7, DR2 presentan un desequilibrio de ligamiento muy fuerte, de manera que normalmente aparecen en el mismo haplotipo. Se ha demostrado que las asociaciones entre los alelos que constituyen cada uno de estos haplotipos y la enfermedad son más fuertes, o dicho de otro modo, el riesgo relativo de padecer la enfermedad para los portadores de un alelo codificado por un determinado locus es mayor, cuanto más próximo se encuentra ese locus a la región HLA-D/DR.

En un estudio reciente de la diabetes mellitus insulín dependiente en relación a los antígenos HLA en la población española (Rodríguez de Córdoba et al., 1980) se ha encontrado que el haplotipo Aw30 — Cw5 — B18 — BfF1 — DR3 se daba con relativa frecuencia en la población diabética, siendo los riesgos relativos para estos antígenos: Aw30 (3,84); Cw5 (5,47); B18 (7,70); BfF1 (10,83); y DR3 (11,09).

Para el caso de las diabetes insulín dependiente en la población española el fragmento del haplotipo Aw30 — Cw5 — B18 — BfF1 — DR3 que aparece con más frecuencia es el BfF1 — DR3. Los individuos con este fragmento presentan más riesgo relativo de padecer la enfermedad que los individuos DR3 o BfF1.

Bajo este planteamiento de que algunas enfermedades pudieran estar asociadas a determinados haplotipos más que a un determinado antígeno concreto, se estudió la incidencia de los haplotipos B18 — BfF1 y B18 — no BfF1 en una muestra de diabéticos insulín dependientes y en una muestra de diabéticos no insulín dependientes, todos pertenecientes a la población española. Como era de esperar el haplotipo B18 — BfF1 estaba significativamente aumentado en la población diabética insulín dependiente, y, lo que es más interesante, en la población diabética no insulín dependiente se encontró significativamente aumentado el haplotipo B18 — no BfF1 (Arnaiz Villena et al., 1980a).

Deficiencias genéticas y Sistema HLA. (Referencia al comienzo de este apartado)

Determinadas deficiencias genéticas como la de C2, C4 o 21-Hidroxilasa (1) están ligadas al Sistema HLA. Aunque no se ha encontrado asociación a ningún antígeno HLA, la herencia en familia se encuentra ligada a determinados haplotipos. La deficiencia de C2 se ha encontrado asociada preferentemente al haplotipo A25 — B18 — Dw2.

¿Qué gen, o genes, serían los responsables directos de estas asociaciones encontradas? (Dausset, 1978)

La asociación entre hemocromatosis idiopática y HLA-A3, como en el caso de la hiperplasia adrenal congénita, y las enfermedades derivadas de la deficiencia de C2 o C4, sin duda implica a un "gen metabólico" del Sistema HLA. La asociación en el caso de la hemocromatosis idiopática a HLA-A3 o la elevada frecuencia del haplotipo A25 — B18 — Dw2 en la deficiencia de C2 se pueden explicar fácilmente por la inclusión de genes metabólicos alterados en determinados haplotipos y que en el caso del de la hemocromatosis idiopática debe de estar muy próximo al locus HLA-A.

(1) Esta deficiencia enzimática desencadena la hiperplasia adrenal congénita.

Para el caso de la espondilitis anquilosante y, tal vez, la enfermedad Quervain, parece que los propios antígenos de histocompatibilidad pudieran ser los responsables directos de la asociación, aunque no se descarta la posibilidad de que los responsables sean otros genes distintos que estén muy estrechamente ligados a los que codifican para estos antígenos de histocompatibilidad.

Por último, algunas asociaciones parece que son reflejo del desequilibrio de ligamiento entre determinados antígenos de histocompatibilidad y genes que confieren susceptibilidad a padecer estas enfermedades, genes de la respuesta inmune.

¿Mediante qué mecanismos estos genes podrían conferir susceptibilidad a padecer estas enfermedades? (Dausset, 1978)

Ya que algunas de estas enfermedades parecen tener un origen infeccioso debido a virus se ha sugerido que los productos de estos genes, sean antígenos de histocompatibilidad o no, constituyan receptores o nivel de membrana para estos virus, o, como hipótesis alternativa, que similitudes entre estos productos y estructuras víricas/o bacterianas imposibiliten organizar una respuesta inmune, provocando tolerancia. (Otro posible mecanismo estaría relacionado con el papel en la eliminación de células infectadas por virus de los antígenos de histocompatibilidad. Véase más adelante en el apartado Función Biológica del Sistema HLA).

El descubrimiento de los genes de la respuesta inmune, codificados en el Complejo Principal de Histocompatibilidad, en el ratón y su existencia más que probable en el Sistema HLA, ha implicado directamente a estos genes en la asociación de determinadas enfermedades al Sistema HLA.

Como no parece probable que pudiera justificarse esta asociación en función de la deficiencia de un gen/genes de la respuesta inmune, se ha sugerido la existencia de genes de la respuesta inmune con una función anómala.

En este sentido, parece probable la existencia de genes de la respuesta inmune responsables de una hiper-respuesta o de una hipo-respuesta inmune. Estos genes estarían incluidos principalmente en determinadas haplotipos. Podría pensarse que A1 — B8 — DR3 sería un haplotipo de hiper-respuesta y que esta anomalía sería en último término la responsable de la aparición de fenómenos autoinmunes.

Otros haplotipos, tal vez A2 — B7 — Dw2, serían de hipo-respuesta y podrían ser responsables de la falta de respuesta a determinados antígenos.

Estos genes no tienen porqué conferir una desventaja al individuo portador, e incluso en determinadas situaciones pueden suponer una ventaja.

En cualquier caso los mecanismos responsables de la asociación HLA y enfermedad se irán progresivamente aclarando a medida que se vaya definiendo el papel biológico real de los productos de los genes del Sistema HLA y se vaya conociendo la etiología de todas estas enfermedades.

5.- DISTRIBUCION TISULAR DE LOS ANTIGENOS HLA (1)

A primera vista parece que los antígenos de histocompatibilidad pudieran dividirse en dos grupos en función de su distribución tisular. Por un lado, los antígenos codificados por los loci HLA-A,-B,-C y, por otro, los antígenos codificados por la región HLA-D/DR.

Los antígenos HLA-A,-B y -C presentan una distribución casi general en el organismo. Estos antígenos se han detectado en todos los tejidos/células estudiadas hasta la fecha con la excepción de los eritrocitos y tal vez los reticulocitos (Williams et al., 1980). Las cantidades de estos antígenos varían, sin embargo, de unos tejidos/células a otros. El bazo es el que presenta más cantidad de antígenos HLA-A,-B y -C y el cerebro el que menos. Parece, además, que proporcionalmente las células expresan más HLA-A y HLA-B que HLA-C en su membrana (Snary et al., 1977).

Los antígenos codificados por la región HLA-D/DR del Sistema HLA, por el contrario, muestran una distribución limitada a determinados tejidos/células.

Se han encontrado antígenos HLA-DR en: linfocitos B, macrófagos, linfocitos "null" (no B, no T), células endoteliales, células Langerhans de la piel, en algunos linfocitos T de sangre periférica, en linfoblastos T en cultivo, en lin-

(1) Se ha excluido de este apartado, intencionadamente, la expresión de antígenos HLA en espermatozoides, ya que será objeto de mayor discusión en otro apartado.

focitos T transformados en cultivo mixto y en células T "asesinas", Wernet, 1976; Stingl et al., 1978; Fu et al., 1978; Evans et al., 1978; Sucio-Foca et al., 1978b.

El riñón es el órgano que presenta más cantidad de HLA-DR después del bazo, mientras que el hígado presenta una cantidad moderada, debido posiblemente a las células Kupffer, y no se detectan antígenos HLA-DR en el cerebro (Williams et al., 1980).

Con respecto a antígenos codificados por el locus HLA-D se ha encontrado que estos determinantes están presentes en linfocitos B, macrófagos, ciertas células de la piel, células de Langherhans (?), y posiblemente en células endoteliales, Lohrmann et al., 1974; Hirschberg y Thorsby, 1975; Moen et al., 1980a.

6.- FUNCION BIOLOGICA DEL SISTEMA HLA.

La extraordinaria persistencia y el aparente perfeccionamiento de este pequeño fragmento de cromosoma o lo largo de la evolución y la similitud de sus estructuras y funciones en todas las especies de vertebrados estudiadas, son hechos suficientes para pensar que este conjunto de genes juega un papel fundamental en el mantenimiento de la integridad del organismo, no solo en la defensa de agentes exteriores, sino, sobre todo, en contra de toda modificación de sí mismo.

Cualquier explicación, sin embargo, de la función biológica real del Sistema HLA debe tener en cuenta las peculiares características de este Sistema, es decir:

- La distribución tisular de los productos del Sistema HLA; donde los antígenos HLA-A,-B,-C aparecen en todas las células nucleadas del organismo, mientras que los productos de la región HLA-D/DR aparecen restringidos a determinadas estirpes celulares con, además, una función efectora aparentemente muy definida. Esta diferencia entre estos dos tipos de productos se apoya además en las diferencias estructurales que muestran entre sí.
- El extremado polimorfismo genético que presentan los loci HLA-A,-B,-C,-DR y -D. Polimorfismo no observado en ningún otro sistema genético a excepción

de las regiones variables de las inmunoglobulinas.

- El elevado número de células T aloreactivas que son capaces de reconocer antígenos del Complejo Principal de Histocompatibilidad en otros miembros de la misma especie; como puede ponerse de manifiesto en el cultivo mixto linfocitario, donde la respuesta o aloantígenos es más violenta que la respuesta xenogénica (a antígenos de especies diferentes).
- La función inmunoreguladora de los productos del Complejo Principal de Histocompatibilidad.

Nuestro conocimiento de la función biológica del Sistema HLA deriva en su mayor parte de estudios realizados en animales, principalmente en el ratón, que podrían ser resumidos así:

- El descubrimiento por McDevitt y Benacerraf (1969) de los genes de la respuesta inmune (I_r) y que estos pertenecen al Complejo Principal de Histocompatibilidad.
- Las observaciones de Doherty y Zinkernagel (1975); Zinkernagel y Doherty (1974) y Shearer (1974) de que los antígenos H-2K y H-2D (equivalentes a los antígenos HLA-A, -B, -C en el hombre) juegan un papel fundamental en la lisis de células infectadas por virus o conjugadas con haptenos.
- Los experimentos de Rosenthal (1978); Rosenthal y Shevach (1973) y Shevach y Rosenthal (1973) que demostraron que los productos genéticos de la región I (equivalente a la región HLA-D/DR en el hombre) están implicados en la cooperación entre macrófagos y linfocitos T, que es de crucial importancia en muchas respuestas inmunes, y
- El descubrimiento por Zinkernagel et al., 1978, de que el timo es el órgano donde los linfocitos T aprenden a reconocer sus propios antígenos de histocompatibilidad.

Según estos hechos el Complejo Principal de Histocompatibilidad estaría implicado en la inmunidad tima-dependiente que comprende la inmunidad mediada

por células y la producción de anticuerpos IgG dirigidos contra una variedad de antígenos, antígenos timo dependientes. La inmunidad timo dependiente es de vital importancia entre otros aspectos en la defensa del organismo de infecciones virales y en el rechazo de injertos. El desarrollo de este tipo de respuesta inmune implica la cooperación de distintos tipos celulares. El Complejo Principal de Histocompatibilidad participa en estas interacciones celulares.

Así, los genes del Complejo Principal de Histocompatibilidad responsables de las interacciones monocitos/células T "helper" y células T "helper"/linfocitos B, son probablemente los mismos, están localizados en la región I del Sistema H-2 del ratón y parecen estar próximos a la región HLA-D/DR en el hombre, aunque en el hombre solo se han encontrado pruebas de esto en el caso de la cooperación monocito/células T "helper" (Hansen et al., 1978; Bergholtz y Thorsby, 1977).

Para que el linfocito T "helper" pueda ser activado, es necesario que reconozca no solo el antígeno extraño, sino también el antígeno HLA-D/DR sobre el monocito que presenta este antígeno extraño al linfocito T "helper".

Mientras que los antígenos HLA-D/DR intervienen en las primeras etapas de la respuesta inmune, los antígenos HLA-A,-B,-C participan principalmente en las últimas; la lisis celular por células asesinas.

Se sabía desde hace tiempo que los ratones infectados con virus de la coriomeningitis linfocítica, LCM, desarrollaban linfocitos T asesinos que podían recogerse del bazo y que específicamente lisaban células infectadas por el virus LCM. Doherty y Zinkernagel, 1975, observaron que estas células T asesinas no lisaban las células infectadas por virus LCM de todas las cepas de ratones, sino solo los de aquellas cepas que compartían antígenos H-2K y/o H-2D con la cepa en la que se habían desarrollado las células T asesinas. Los antígenos Ia (homólogos a los antígenos HLA-D/DR) no estaban implicados en este proceso.

En base a estas observaciones de que las células T asesinas no con el virus en la célula infectada, sino con ambos, el virus y los antígenos H-2D y H-2K, propusieron (Doherty y Zinkernagel, 1975; Zinkernagel y Doherty, 1974) las hipótesis de "Dual recognition" y "Altered self" ("Dual recognition" implica que hay dos receptores independientes, uno para el antígeno extraño y otro para

el producto autólogo del Complejo Principal de Histocompatibilidad; "Altered self" supone que existe una interacción entre el antígeno extraño y el producto del Complejo Principal de Histocompatibilidad a resultas de la cual este último queda alterado y es reconocido como tal producto alterado}.

Se ha demostrado que los antígenos HLA-A,-B,-C juegan en el hombre un papel similar al de los antígenos H-2K y H-2D en el ratón:

- Gulmy et al., 1977, demostraron ésto en la lisis de células masculinas (portadoras del antígeno H-Y) por linfocitos femeninos sensibilizados contra células masculinas.
- Dickmeiss et al., 1977, lo observaron en la lisis de linfocitos conjugados con el hapteno dinitrofluorobenceno (DNFB) y
- McMichael et al., 1977, demostraron que la lisis de células infectadas por un virus de la gripe estaba también bajo restricción HLA-A,-B,-C.

Hay que resaltar que un antígeno, HLA-A2, parecía ser más efectivo que los demás en el funcionamiento de los dos primeros sistemas, mientras que el HLA-B7 era más eficaz en el último. Este fenómeno estaría de acuerdo con la hipótesis de presentación, según la cual ciertos antígenos HLA son mejores en la presentación de ciertos antígenos extraños mientras que otros antígenos HLA presentan preferentemente otros antígenos extraños diferentes. Este fenómeno se ha observado también en el ratón (Bubbers et al., 1978).

Si este mismo fenómeno se da para los antígenos la (HLA-D/DR en el hombre), podría explicar fácilmente porqué algunos antígenos HLA están asociados con una alta y otros con una baja respuesta a determinados antígenos extraños.

Los Sistemas de Histocompatibilidad han evolucionado hacia la diferenciación individual de los organismos superiores.

En procordados la individualidad queda amparada dentro de la colonia. Se sabe que la unión de los individuos para constituir la colonia depende de el reconocimiento de algún alelo en común para un sistema de histocompatibilidad primitivo que podríamos denominar de reconocimiento.

En algunos champiñones (*Podospora anserina*) la existencia de dos alelos diferentes impide la fusión de dos organismos de la misma especie.

En mamíferos, la hipótesis del reconocimiento "Altered self" de los antígenos HLA podría explicar la existencia de clones capaces de reconocer específicamente, sin inmunización previa, aloantígenos en individuos de su misma especie. Se puede considerar esta respuesta a aloantígenos como una respuesta contra "antígenos propios alterados".

Este fenómeno podría interpretarse como una defensa del organismo al parásito potencialmente más peligroso, que sería un miembro de la misma especie, de la misma familia. Que estaría justificado para evitar la aparición de células mutantes dentro de un mismo organismo o, por ejemplo, para evitar la posibilidad de contagio dentro de una misma especie por tumores cancerígenos.

Desde este punto de vista el gran polimorfismo genético del Sistema HLA sería una ventaja evolutiva.

La formación y mantenimiento del polimorfismo genético podría además explicarse en función de la ventaja selectiva que parece poseer los heterocigotos.

Por lo que se ha comentado hasta aquí existen pruebas en la actualidad que permiten suponer que los individuos heterocigotos para los genes del Sistema HLA estarían en situación ventajosa. Por ejemplo, la heterocigosis en un locus Ir podría asegurar una respuesta inmune alta a dos juegos diferentes de antígenos extraños, correspondientes a cada antígeno Ir. Además, individuos que son heterocigotos para los loci HLA-A, -B, -C tendrían dos veces más antígenos con los que cooperar en la lisis de células infectadas por virus que los individuos homocigotos.

Doherty y Zinkernagel, 1975, observaron que los ratones heterocigotos para el Sistema H-2 desarrollaban una respuesta más efectiva hacia las células infectadas con virus que los ratones homocigotos.

En muchas especies vegetales la heterocigosis para determinados sistemas está garantizada, ya que la autofecundación es imposible. Los gametos masculinos reconocen a los gametos femeninos mediante el Sistema S. En la mayoría de las especies vegetales la disparidad (incompatibilidad) de los dos gametos, a

nivel del Sistema S es necesario para la fecundación. Un mecanismo parecido opera en abejas. (Dausset, 1978)

Aunque en el caso de los mamíferos, la fertilidad en líneas puras de ratones nos indica que no interviene este mecanismo o que ha desaparecido, algunos hechos, como el observado en una población aislada en el Sahara de Tuaregs, con un elevado grado de consanguinidad, donde no se ha encontrado un solo individuo homocigoto para el Sistema HLA, parecen indicar que bien a nivel de fertilización, o en estadios anteriores al nacimiento, pueden estar implicados mecanismos genéticos que favorezcan la heterocigosis para el Sistema HLA (Tal vez un sistema similar al Sistema T/t del ratón; letal para los homocigotos T/T y algunos t/t. Artzt y Bennett, 1975).

7.- SISTEMA HLA EN ESPERMATOZOIDES.

El semen humano contiene varias clases de antígenos. Los antígenos correspondientes a los grupos sanguíneos A y B se expresan en espermatozoides (Landsteiner y Levine, 1926). Se ha demostrado asimismo que los antígenos de los Sistemas MN y Tja están también presentes en los espermatozoides (Edwards et al., 1964) y que en plasma seminal hay antígenos que corresponden al Sistema Lewis (Logde y Usher, 1962).

A) ANTIGENOS HLA-A,-B,-C EN ESPERMATOZOIDES

Vojtiskova et al., 1969, encontraron que la absorción con preparaciones de espermatozoides de ratón, obtenidos del epididimo y vaso deferente, de antiseros anti-H-2 inhibían la reacción de hemoaglutinación de estos sueros. Estas preparaciones, que presentaban un 10-12% de contaminación de otras células, principalmente células epiteliales, absorbían menos actividad de los sueros anti-H-2, que preparaciones equivalentes de células de bazo o de sangre periférica.

Mediante estudios de inmunofluorescencia indirecta utilizando antiseros anti-H-2 estos mismos autores encontraron que la fluorescencia se localizaba en una porción definida de la superficie del espermatozoide; en el acrosoma.

Goldberg et al., 1970, mediante técnicas de citotoxicidad mediada por complemento y tinción posterior con azul tripan sobre preparaciones similares de espermatozoides de ratón, observaron que sueros anti-H-2 mataban específicamente los espermatozoides. Además, el % de espermatozoides muertos aumentaba cuando el ensayo se realizaba sobre los espermatozoides de ratones homocigotos para la especificidad contra la que iba dirigido el suero anti-H-2.

Encontraron, además, alguna prueba de que la cantidad de antígenos H-2 disminuye, o al menos queda enmascarada, durante la maduración de los espermatozoides.

Simultáneamente a los experimentos en ratón, Fellous y Dausset, 1970, encontraron que sueros anti-HLA (correspondientes hoy a especificidades codificadas por los loci HLA-A y HLA-B) mataban los espermatozoides humanos de individuos que poseían la especificidad HLA contra la que iban dirigidos los sueros. La técnica de detección empleada por estos autores fue un ensayo de citotoxicidad mediado por complemento y tinción posterior de los espermatozoides muertos con azul tripan.

Los espermatozoides pertenecían a individuos de genotipo HLA conocido. Al utilizar distintas combinaciones de dos sueros anti-HLA dirigidos contra dos antígenos HLA diferentes presentes en el mismo individuo, observaron que aquellos combinaciones que incluían sueros dirigidos contra dos antígenos correspondientes a distintos haplotipos mataban más espermatozoides que cuando los sueros estaban dirigidos contra dos antígenos HLA presentes en el mismo haplotipo. Ya que esta diferencia fue significativa ($p < 0,001$), estos autores la justificaron en función de que la expresión de estos productos en los espermatozoides se realizaba de una manera haploide.

Kerek et al., 1972, mediante ensayos similares de citotoxicidad sobre espermatozoides humanos en presencia de complemento, con tinción posterior utilizando azul tripan y eosina, y mediante experimentos de absorción con estos espermatozoides confirmaron los resultados obtenidos por Fellous y Dausset, demostrando que la citotoxicidad hacia espermatozoides y la absorción de sueros anti-HLA

era específica para aquellas preparaciones de espermatozoides pertenecientes a individuos que presentaban la especificidad HLA contra la que iba dirigido el suero. Estos autores encontraron, además, que los sueros anti-HLA no inmovilizaban los espermatozoides.

Halim et al., 1974, mediante técnicas de simple y doble fluorescencia, directa e indirecta, demostraron la presencia de antígenos HLA-A y HLA-B en la membrana de los espermatozoides, localizándolos en una banda estrecha en posición post-acrosomal en la cabeza del espermatozoide. Mediante la utilización de dos sueros anti-HLA conjugados con fluoresceína o rodamina y dirigidos contra antígenos de los dos haplotipos HLA de un individuo, estos autores encontraron dos poblaciones de espermatozoides, cada una portando la especificidad HLA correspondiente a cada uno de los dos haplotipos. Posteriormente estos autores confirmarían sus resultados mediante microscopía electrónica (Halim, A. , Festenstein, H. y Manston, J., resultados no publicados).

Y más tarde, Arnaiz Villena y Festenstein, 1976, y Festenstein et al., 1978, mediante técnicas de citotoxicidad mediada por complemento demostraron la existencia de dos poblaciones de espermatozoides, cada una portando las especificidades HLA-A,-B correspondientes a un haplotipo de los dos que presenta el individuo. Estos autores, encontraron, además, que sueros anti-HLA-C no mataban apreciablemente los espermatozoides de individuos que poseían la especificidad HLA-C correspondiente.

La expresión haploide de los antígenos HLA-A y HLA-D en la membrana de los espermatozoides puede utilizarse para deducir el genotipo HLA de un individuo sin necesidad de estudios familiares (Arnaiz Villena y Festenstein, 1976).

Fellous et al., 1976, encuentran que la β_2 -microglobulina, proteína asociada a las cadenas de HLA-A,-B,-C, está presente en la membrana de los espermatozoides humanos y que se localiza en posición post-acrosomal, coincidiendo con la localización descrita para los antígenos HLA-A y HLA-B, además de en otros puntos de la superficie del espermatozoide.

Law y Bodmer, 1978, por el contrario mediante el empleo de dos ensayos diferentes, técnicas de microinmovilización y microaglutinación de esperma-

tozoides, y técnicas de inhibición con espermatozoides o plasma seminal, no han detectado la presencia de antígenos HLA-A,-B en la superficie de los espermatozoides ni en plasma seminal. Sin embargo, encuentran que Γ_2 -microglobulina parece ser el principal componente (0,021 mg/ml) del plasma seminal. La presencia de esta proteína en la superficie de los espermatozoides parece ser debida, en su mayor parte, a absorción de la existente en plasma seminal.

La presencia de antígenos HLA-A,-B,-C, ha sido investigada por diferentes técnicas directas o indirectas con distinta sensibilidad, lo que explica en cierto modo la discrepancia de los resultados encontrados por algunos grupos.

Los experimentos de citotoxicidad directa mediada por complemento sobre espermatozoides utilizando tinción específica para distinguir los espermatozoides vivos de los muertos (Festenstein et al., 1978), parecen más apropiados que las técnicas de microinmovilización y microaglutinación de espermatozoides (Law y Bodmer, 1978), para detectar la presencia de antígenos HLA en la membrana de los espermatozoides. Esta última técnica presenta el problema de que parte con un fondo de un 50% de espermatozoides aglutinados o inmóviles.

Por otro lado, la presencia de otras células distintas de los espermatozoides en las preparaciones utilizadas para absorber antisueros anti-HLA-A y anti-HLA-B pudiera ser responsable de la absorción de la mayor parte de la actividad presente en estos sueros; la cantidad de antígenos HLA-A y HLA-B en espermatozoides puede haberse sobreestimado por el empleo de estas preparaciones.

B) PRODUCTOS DE LA REGION HLA-D/DR EN ESPERMATOZOIDEOS

Hammerling et al., 1975, mediante técnicas de citotoxicidad directa y absorciones, utilizando sueros multiespecíficos dirigidos contra todos los antígenos asociados con la región I^k o I^s (equivalentes a la región HLA-D/DR en el hombre) han detectado la presencia de estos antígenos en la superficie de los espermatozoides de ratón.

Estos hechos junto con el encontrado por Levis et al., 1975, 1976,

de que preparaciones de espermatozoides humanos estimulaban a linfocitos alogénicos en cultivo mixto, plantearon la posibilidad de que productos de la región HLA-D/DR estuvieran presentes en la superficie de los espermatozoides. Ya que la expresión en espermatozoides de los productos del Sistema HLA parecía realizarse de una manera haploide, se pensó en que los espermatozoides pudieran utilizarse como células homocigotas de tipaje en cultivo mixto; cada individuo proporcionaría dos poblaciones de espermatozoides, correspondientes cada una a un haplotipo diferente, salvando así el grave problema planteado por la escasez, y dificultad de obtención, de células homocigotas de tipaje, HTC.

En este sentido, Halim y Festenstein, 1975; Festenstein et al., 1977; Festenstein y Halim, 1978, utilizando espermatozoides frescos y Halim et al., 1979, utilizando espermatozoides congelados, purificaron las poblaciones de espermatozoides correspondientes a cada haplotipo HLA y las utilizaron como estimuladoras del cultivo mixto.

La separación de las poblaciones de espermatozoides la realizaron mediante el tratamiento previo de la suspensión de espermatozoides totales con un antisuero anti-HLA dirigido contra una de las especificidades HLA-A o HLA-B de las dos que posee el individuo, y complemento. Posteriormente eliminaron los espermatozoides muertos pasando la suspensión por una columna de nylon.

Utilizando estas preparaciones estos autores han presentado pruebas a favor de la expresión haploide de productos HLA-D en la superficie de los espermatozoides y de su utilización como células homocigotas de tipaje.

Law y Bodmer, 1978, en función de sus resultados de serología sobre espermatozoides utilizando sueros anti-HLA-DR, plantearon la posibilidad de que las estimulaciones encontradas por estos autores, señalados anteriormente, se debieran a la presencia de otras células distintas de los espermatozoides, que contaminaran las preparaciones de espermatozoides. Aunque la suposición de estos autores no posee ningún soporte experimental hay que señalar, sin embargo, que Misko et al., 1978, han presentado pruebas de que células presentes en el semen de individuos vasectomizados, donde no hay espermatozoides, son capaces de

estimular en cultivo mixto a linfocitos de individuos alogénicos.

Recientemente Levis y Dattner, 1979, han observado que la luz ultravioleta afecta de un modo diferente a los determinantes que estimulan a los linfocitos alogénicos en cultivo mixto presentes en espermatozoides que o los presentes en linfocitos.

Por otro lado, estos mismos autores han encontrado que linfocitos sensibilizados en cultivo mixto con espermatozoides, no responden en cultivo secundario a esos mismos espermatozoides. Aunque, aparentemente sí muestran una respuesta de tipo secundario cuando la reestimulación se realiza con los linfocitos del mismo individuo donante de los espermatozoides.

Los resultados acerca de la presencia de antígenos HLA-DR en los espermatozoides humanos parecen indicar que estas moléculas no se expresan en la superficie de estas células.

Dausset et al., 1980, mediante el empleo de anticuerpos monoclonales anti-HLA-DR y Tossi (Ferrara, 1980) mediante técnicas de "binding" utilizando anticuerpos anti-HLA-DR marcados con 125 I no han detectado antígenos HLA-DR en la superficie de los espermatozoides.

Los resultados preliminares de Festenstein et al., 1980, indicando que la actividad anti-HLA-DR puede eliminarse cuando se realizan absorciones con espermatozoides en proporciones superiores a 17×10^6 células/ μ l de suero, parecen poder explicarse por absorción inespecífica, dilución o debida a la presencia de células contaminantes presentes en sus preparaciones, y que para esas cantidades constituirían un número apreciable.

Las estimulaciones originadas en el cultivo mixto de linfocitos parecen responder al reconocimiento de diferentes aloantígenos codificados por la región HLA-D/DR del Sistema HLA, por otras regiones del Sistema HLA e incluso fuera del Sistema HLA. Este hecho, y el que no se detecten antígenos HLA-DR en espermatozoides y las diferencias entre los resultados del grupo de Festenstein y del grupo de Levis en cuanto a la magnitud de las respuestas del cultivo mixto espermatozoides-linfocitos, y otros aspectos experimentales, plantean la posibilidad

de que bien otros sistemas de aloantígenos diferentes de los HLA-D y/u otros poblaciones celulares sean los responsables directos de estas estimulaciones.

C) ACTIVACION DE GENES LIGADOS AL SISTEMA H-2 DURANTE LA ESPERMATOGENESIS.

La expresión de productos en la superficie de los espermatozoides de ratón codificados por el fragmento próximo a la región donde se encuentra localizado el Sistema H-2 planteó la posibilidad de que ésta fuera una región que de algún modo se activara durante la espermatogénesis.

El estudio de la expresión de determinados antígenos codificados dentro de este fragmento de cromosoma durante la espermatogénesis en el ratón ha revelado que los genes ligados a la región H-2 no se expresan simultáneamente en los espermatozoides: los antígenos H-2K, y H-2D e la que están expresados oparentemente de un modo coordinado en los espermatozoides mapean o ambos lados del locus Ss, Slp cuyos productos no aparecen en los espermatozoides. Asimismo, los antígenos Tla no se expresan en espermatozoides de ratón y la isoenzima defosfoglicerokinasa, específica de espermatozoides, Pgk-2 aparece en un estadio posterior al que los hacen los antígenos H-2K, H-2D e la (Erickson, 1977).

La expresión de productos codificados por genes ligados al Complejo Principal de Histocompatibilidad en el hombre (Sistema HLA) no ha sido investigada.

D) SISTEMA HLA Y FERTILIDAD.

Se conoce la existencia en algunas plantas de sistemas de reconocimiento, Sistema S, entre gametos que evitan la posibilidad de la autofecundación (Brewbaker y Garrez, 1967; Brandham y Owens, 1978). Para que se produzca la fecundación los alelos de ambos gametos para este sistema han de ser diferentes (incompatibles).

Las colonias de tunicados son clones sesiles de individuos genéticamente idénticos que se originan a partir de una sola larva de vida móvil. Aunque son hemafroditas, no pueden fertilizar sus propios huevos. Estudios realizados en uno

de estas especies de tunicados, *Botryllus primigenus*, han mostrado que poseen un sistema primitivo de histocompatibilidad, constituido por múltiples alelos codificados por aparentemente un solo locus, F. La fusión de los individuos de dos colonias diferentes requiere la identidad de al menos de uno de los dos alelos F.

A nivel de fertilización, sin embargo, estos alelos F intervienen de una manera completamente diferente. Solo espermatozoides diferentes para el locus F pueden fertilizar el huevo, ya que solo éstos, pueden atravesar las capas de células diploides que rodean el huevo durante la fertilización. Los espermatozoides singénicos no pueden fertilizar y este hecho explica que las colonias hemafroditas sean estériles (Simonsen, 1976).

Este fenómeno en fertilización puede haber favorecido mutaciones asegurando un locus altamente polimórfico.

La posterior evolución de este sistema primitivo hacia los sistemas de histocompatibilidad que presentan los mamíferos puede haber transcurrido mediante etapas de duplicación génica, mutaciones, sobrecruzamientos desiguales y selección, todo ello en analogía con el desarrollo supuesto para las inmunoglobulinas.

La ventaja de los heterocigotos para el Complejo Principal de Histocompatibilidad se señaló en el apartado referente a la función biológica del Sistema HLA.

Las líneas congénicas de ratones, homocigotas para el Sistema H-2, se originaron en el laboratorio mediante cruces continuados de individuos consanguíneos. Estos ratones, sin embargo, poseen una capacidad reproductora muy disminuida comparada con la de los ratones salvajes. El mantenimiento de la línea congénica depende del aislamiento en el laboratorio de estos individuos.

En *Botryllus primigenus*, esta especie de tunicados comentada anteriormente, bajo determinadas condiciones experimentales (tratamiento enzimático) se puede conseguir que espermatozoides singénicos atraviesen la capa de células diploides que rodean el huevo. Estos espermatozoides una vez atravesada la capa celular son capaces de fertilizar el huevo de un modo idéntico al que lo haría un espermatozoide alogénico.

En el hombre, aunque en alguna población natural aislada parece existir una selección negativa hacia los homocigotos para el Sistema HLA, Dausset, 1978,

no se ha encontrado un aumento significativo del número de heterocigotos en la descendencia de individuos consanguíneos.

La influencia de la mayor o menor compatibilidad HLA-A,-B entre el hombre y la mujer y la fertilidad, estimada en función del número de hijos, ha sido investigada por Mittal, 1975, no encontrando ninguna relación entre mayor o menor compatibilidad, o la presencia de anticuerpos linfocíticos, y el número de hijos en 67 familias estudiadas. Las familias empleadas por Mittal fueron seleccionadas de manera que tuvieran uno o más hijos. Queda, por tanto, por determinar el papel de estos antígenos en el caso de parejas infértiles o con fertilidad disminuida.

Johansen y Festenstein, 1974, han encontrado un aumento significativo del número de varones en la descendencia de mujeres primíparas que habían desarrollado anticuerpos anti-HLA. Este aumento era más considerable cuando los anticuerpos anti-HLA eran monoespecíficos.

La presencia de antígenos HLA, seguramente de una manera haploide, en la superficie de los espermatozoides plantea la posibilidad de que desempeñen un papel en fertilización.

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y SU OBTENCION

1.- MEDIOS DE CULTIVO, TAMPONES Y REACTIVOS MENCIONADOS EN EL TEXTO.

Antibióticos

Para la preparación del antibiótico, mezclar:

1 vial de Cloxamp 500 mg (Bencard, Fcdo. por Becham, SA, España)

1 vial de Gevramycina, 80 mg (Schering, Co, USA), y

18 ml de agua destilada esteril.

Se repartió en alícuotas de 1 ml en condiciones estériles y se congeló a -80°C . 1 ml de esta solución de antibiótico se añadió a cada 100 ml de medio de cultivo.

La concentración de antibiótico final en el medio es:

Gentamicina 40 μg /ml

Ampicilina 125 μg /ml

Cloxacilina 125 μg /ml

Medio Hanks

Preparado a partir de la solución: (10x) Hanks' Balanced Salt Solution (modified) (Flow Laboratories, U.K.).

pH : 7,2-7,4 (ajustado con CO_3HNa 7,5%)

Con antibiótico.

Medio 199

Preparado a partir de la solución: (10x) Medium 199 (modified) with Hanks' Salts (Flow Laboratories, U.K.)

pH : 7,2-7,4 (ajustado con CO_3HNa 7,5%)

Con antibiótico.

Suero de ternera fetal

Foetal Bovine Serum (Flow Laboratories, U.K.)

Descomplementado por calentamiento durante 30 min a 56°C.

Se comprobó que no fuera citotóxico sobre linfocitos totales, o linfocitos B en ensayo standard de microlinfocitotoxicidad en presencia o ausencia de complemento.

Se le añadió antibiótico a la concentración señalada para otros medios.

Medio de Congelación

Medio 199 suplementado con 40% de suero de ternera fetal.

Suero AB Rh positivo (de individuos AB Rh⁺)

Suero humano AB Rh⁺ obtenido a partir de plasma AB Rh⁺ recalcificado con Cl₂Ca 1M y defibrinado posteriormente (1). Descomplementado por calentamiento a 56°C durante 30 min.

Se comprobó su no citotoxicidad frente a linfocitos totales, linfocitos B y espermatozoides en presencia y ausencia de complemento.

Se le añadió antibiótico a la concentración señalada para otros medios.

PBS

Phosphate Buffered Saline, pH : 7,2

Concentración (x1000 ml)

ClNa 80 g

ClK 2 g

PO₄HNa₂ 11,5 g

PO₄H₂K 2 g

(1) La defibrinación se realizó en un matraz con 40-50 perlas de vidrio en una placa de agitación durante una hora a temperatura ambiente.

Complemento de conejo

Se han utilizado dos fuentes de complemento de conejo.

- 1.- Preparado comercial liofilizado del Instituto Behring (W. Germany) que previamente se había comprobado no mostraba citotoxicidad contra linfocitos totales, linfocitos B o espermatozoides.
- 2.- Ocasionalmente y sobre todo en los experimentos de citotoxicidad sobre espermatozoides, se utilizó suero de conejo obtenido por punción en la vena marginal de la oreja de conejos de raza neozelandesa blanca. Como en el caso anterior se comprobó la ausencia de actividad citotóxica frente a linfocitos totales, linfocitos B o espermatozoides. Esta segunda fuente de complemento se señala en el texto como "complemento de conejo" simplemente.

Medio de cultivo

Medium RPMI 1640 (pH : 7,2 ajustado con CO_3HNa) (Flow Laboratories, U.K.) suplementado con 20% de suero AB Rh⁺ L-Glutamina (2mM) y antibiótico a la concentración señalada para otros medios.

Líquido de centelleo

Compuesto por Tolueno, PPO, POPOP (1000 ml, 4 g, 50mg).

PPO: 2,5-difeniloxazol (Sigma Chemical Company, USA)

POPOP: 1,4-bis-2-(5-feniloxazolil)-benceno (Sigma Chemical Company, USA)

Antisero Anti-Factor B

Sheep Anti-human Factor B (Immunostic, Seward Laboratories, U.K.)

Este antisuero es específico anti-factor B, no reacciona con ninguna otra proteína plasmática como pudimos comprobar mediante inmunoelectroforesis de un "pool" de sueros humanos frescos, donde daba un solo arco de precipitación.

2.- OBTENCION DE LINFOCITOS TOTALES

Los linfocitos se obtuvieron a partir de sangre periférica desfibrinada. La sangre se extrajo al vacío mediante el Sistema Venojet (Terumo, Tokyo) utilizando tubos de vidrio provistos de 40-50 perlas de poliestireno de 1,5 mm. de diámetro. La desfibrinación se realizó mediante agitación rotatoria horizontal durante 10-15 min., con lo que se consigue retener el coágulo de fibrina alrededor de las perlas. Después de separar el coágulo la sangre se diluyó 1/2 con Medio Hanks.

El aislamiento de los linfocitos del resto de las células sanguíneas se realizó mediante un gradiente de densidad. 4 ml de la sangre diluida se colocaron sobre 3 ml de una solución de Ficoll-Isopaque (d: 1,077) (Lymphoprep) (Nyegaard & Co. Oslo) procurando que no se mezclaran las fases y se centrifugó a 600g durante 40 min. en una centrífuga Sorvall-GLC-2. Los linfocitos se recogieron de la interfase y después de lavarlos tres veces con Medio Hanks (10 ml; 10 min.; 400g) se resuspendieron en un medio apropiado y a una concentración conveniente según se fueran a utilizar posteriormente. El rendimiento de la operación oscila alrededor de 1×10^6 linfocitos/ml de sangre de partida. Para el conteo de los linfocitos se utilizó una cámara de Neubauer en un microscopio de contraste de fase.

3.- OBTENCION DE LINFOCITOS B

La separación de las poblaciones de linfocitos B y T se realizó según el método de Gutierrez et al. (1979) con ligeras modificaciones. En resumen, la separación se basa en las diferencias existentes entre las densidades de las distintas poblaciones linfocitarias y consiste en una centrifugación en un gradiente discontinuo de densidad. Para la preparación del gradiente se utiliza un coloide de Silice alterado por Polivinilpirrolidona, inerte, comercializado como Percoll (d: 1,130) (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Suecia).

Preparación del gradiente:

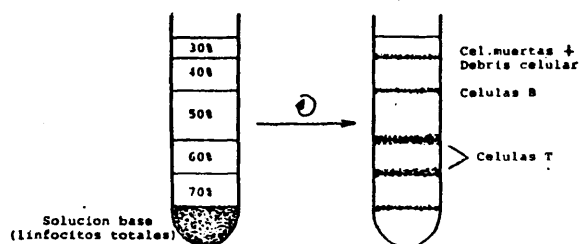
Solución base: 9ml de la solución de Percoll + 1ml de Medio 199 (10x) sin CO_3HNa .

A partir de esta solución base por dilución con Medio 199 se preparan:

Solución 70%:	7 ml. solución base + 3ml Medio 199
Solución 60%:	6 ml. solución base + 4ml Medio 199
Solución 50%:	5 ml. solución base + 5ml Medio 199
Solución 40%:	4 ml. solución base + 6ml Medio 199
Solución 30%:	3 ml. solución base + 7ml Medio 199

Los linfocitos totales, obtenidos según se indicó, se resuspendieron en 1ml. de la Solución base. Sobre esta fase se colocaron sucesivamente 2ml de la Solución 70%, 2ml de la Solución 60%, 4ml de la Solución 50%, 2ml de la Solución 40% y 1ml de la Solución 30%, procurando que no se mezclaran las fases entre sí. Para la formación del gradiente se utilizaron tubos de 12ml

Una vez constituido el gradiente se centrifugó a 1.600 g durante 10 min. en una centrifuga Sorvall- GLC-2. Los linfocitos B se recogieron de la interfase 50%-40% y se lavaron dos veces en Medio Hanks suplementado con 40% de suero de ternera fetal (10ml.; 10 min.; 400g).



SEPARACION CELULAS B

4.- CONGELACION DE LINFOCITOS

Habitualmente los linfocitos totales una vez aislados y lavados, se dividieron en alícuotas conteniendo $1-3 \times 10^6$ células y se congelaron, manteniéndose en fase gaseosa de N_2 líquido hasta el momento de su utilización.

El proceso de congelación se realizó de la siguiente manera:

Los linfocitos totales, obtenidos tal como se indicó anteriormente, se resuspendieron en Medio de Congelación a una concentración de $6-18 \times 10^6$ células/ml, según el caso, manteniéndose la suspensión a $4^\circ C$ durante 10-20 min.

Sobre esta suspensión se añadió gota a gota, con agitación suave y constante y a $4^\circ C$, idéntico volumen de Medio de Congelación con 20% de DMSO (Dimethyl Sulfoxide (DMSO) grado 1, Sigma Chemical Company, USA). La suspensión resultante se repartió rápidamente en alícuotas de 300 μl en tubos de plástico tipo Beckman y los tubos se sumergieron inmediatamente en un baño de metanol enfriado previamente a $4^\circ C$. La temperatura se disminuyó después progresivamente en $1^\circ C/min$ (1). A una temperatura entre $-40^\circ C$ y $-50^\circ C$ se sacaron los tubos y se introdujeron en N_2 líquido. Después de lo cual se conservaron en fase gaseosa de N_2 líquido en contenedores LR-40 (Union Carbide, U.K.) hasta el momento de su utilización.

Para la descongelación, los tubos conteniendo las células congeladas se sacaron del N_2 y se introdujeron rápidamente en un baño de agua a $37^\circ C$ sin dejar que se descongelaran del todo. Con ayuda de una pipeta Pasteur se traspasó el contenido a tubos de 10ml y se añadió 1 ml de Medio de Congelación gota a gota con suave agitación constante. Se completó el volumen del tubo con Medio de Congelación y se mantuvo 10 min a temperatura ambiente.

Las células descongeladas se lavaron dos veces con Medio 199 (10ml; 10min; 400g) antes de su utilización.

La viabilidad y número de las células descongeladas se estimó por observación en un microscopio provisto de contraste de fase en una cámara de Neubauer. El rendimiento de la congelación osciló alrededor del 80%.

(1) Esta operación se realizó en una cámara de congelación Multi-Cool (FTS Systems, USA).

5.- SEMEN

Las muestras de semen 2-4ml, donadas por voluntarios sanos de edades comprendidas entre 21-35 años de edad, previamente tipados para los loci HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6, -DR y -D, se recogieron en tubos esteriles de 30ml (tipo universal) y fueron llevadas al laboratorio en el plazo de 1-2 horas a partir del momento de su obtención.

A) OBTENCION DE PLASMA SEMINAL

El semen se centrifugo a 1.600 g durante 30 min en una centrifuga refrigerada a 4°C. El sobrenadante, plasma seminal, se recogió con ayuda de una pipeta Pasteur, se alicuotó en pequeños volúmenes y después de congelarlo en N₂ líquido se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

B) OBTENCION DE CELULAS SEMINALES TOTALES

El semen se diluyó con 30ml de PBS (pH 7,2-7,4) y se centrifugó a 400g durante 25 min a temperatura ambiente. El sedimento se resuspendió en Medio 199+5% suero AB Rh⁺ y se centrifugó durante otros 25 min a 400g. El sedimento conteniendo las células seminales totales se resuspendió en 2-4ml de Medio 199+5% suero AB Rh⁺ y se mantuvo durante 10-15 min en un baño de agua a 37°C para permitir la recuperación de los espermatozoides.

La preparación obtenida de este modo, $2-4 \times 10^8$ espermatozoides, contenía 10%-20% espermatozoides inmóviles y entre 1-5%, dependiendo de los individuos, de células seminales no espermatozoides (C.S. no E.) en su mayor parte células epiteliales de descamación de las vías urinarias.

C) OBTENCION ESPERMATOZOIDES PUROS

Para la purificación de espermatozoides se han utilizado dos métodos similares, ambos basados en el mismo hecho: la movilidad de los espermatozoides.

Método 1

El semen diluido con 30ml de PBS (pH 7,2-7,4) se centrifugó a 400g durante 25 min a temperatura ambiente. El sedimento conteniendo espermatozoides vivos y muertos y otras células seminales se resuspendió en Medio 199 + 5% suero AB Rh⁺. Después de mantener la suspensión durante 10 min a 37°C se dividió en múltiples alícuotas, habitualmente conteniendo 2-3ml, que se centrifugaron de nuevo en una centrífuga Wifug a 2.500g durante 1 min. Una vez centrifugados y procurando no remover el sedimento, los tubos se mantuvieron al menos 20 min en un baño de agua a 37°C sin agitación.

En estas condiciones los espermatozoides móviles son capaces de abandonar el sedimento y ascender por él sobrenadante. Los espermatozoides inmóviles y otras células seminales, sin embargo, quedan retenidas en el sedimento.

Transcurridos los 20 min se recogieron todos los sobrenadantes en un tubo de 30 ml (tipo universal) y se centrifugó a 400g durante 20 min a temperatura ambiente (1). El sedimento se resuspendió en 2-4ml de Medio 199 + 5% suero AB Rh⁺ y se permitió recuperar a los espermatozoides por al menos 10 min en un baño de agua a 37°C. Esta suspensión contiene habitualmente más de 10⁸ espermatozoides móviles, sin contaminación de espermatozoides inmóviles o muertos o de otras células seminales.

(1) Ocasionalmente se realizó esta centrifugación a 4°C en una centrífuga refrigerada. Este tratamiento frío no afecta la viabilidad de los espermatozoides, solo disminuye su movilidad momentáneamente, y permite obtener alrededor de un 30% más de espermatozoides en unas condiciones de centrifugación algo más suaves (400g; 10 min).

Método 2

El semen sin diluir se dividió en volúmenes conteniendo 0,5-1ml cada uno en tubos de 30 ml (tipo universal). Sobre este volumen de semen se colocaron 20-25ml de Medio 199+5% suero AB Rh⁺ procurando no mezclar las fases. Los tubos se mantuvieron durante 20 min en un baño de agua a 37°C. En estas condiciones los espermatozoides móviles son capaces de abandonar el semen pasando al Medio 199+5% suero AB Rh⁺.

Después de este tiempo se recogió la mayor cantidad de Medio 199 + 5% suero AB Rh⁺ posible procurando no remover la interfase y, después de transferirlo a otro tubo de 30 ml, se centrifugó a 400g durante 20 min a temperatura ambiente. El sedimento se lavó con Medio 199.

Los espermatozoides se resuspendieron en 2-4ml de Medio 199 + 5% suero AB Rh⁺. Esta suspensión contiene, dependiendo de los individuos, más de 10⁸ espermatozoides móviles sin contaminación de espermatozoides inmóviles o muertos, o de otras células seminales.

El semen y el poco Medio 199+5% suero AB Rh⁺ que quedaba en los tubos iniciales se mezcló por agitación y se utilizó para la obtención de más espermatozoides puros, según el Método 1, o para la obtención de células seminales no espermatozoides.

D) OBTENCION DE CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES (C.S. no E.)

El semen diluido con Medio 199+5% suero AB Rh⁺ (15ml) se colocó sobre 8ml de una solución de Ficoll-Isopaque (d: 1,077) (Lymphoprep) y se centrifugó a 600g durante 30 min. En estas condiciones de la interfase pueden recogerse sin contaminación de espermatozoides otras células seminales, en su mayoría células de descamación de origen epitelial y también linfocitos. En el fondo del tubo quedan los espermatozoides y otras células seminales de densidad superior a 1,077. La suspensión de células seminales no espermatozoides se lavó dos veces en Medio Hanks (10ml; 10min; 400g).

DETERMINACION DE LOS ANTIGENOS

HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6.

1.- TEST DE MICROCITOTOXICIDAD SOBRE LINFOCITOS.

El tipaje de los loci HLA, -A, -B, -C, -Bw4, Bw6 de los individuos se realizó mediante un ensayo standard de microlinfocitotoxicidad en dos etapas, Mittal et al. (1969), sobre linfocitos totales utilizando una batería de 120 antisueros anti-HLA.

Los antisueros (1) se dispusieron en placas especiales para tipaje (Terasaki, tipo Falcon, Sterilin, etc.) provistas de 60 pocillos de 10-15 μ l de volumen (1 μ l de antisuero por pocillo), se recubrieron de parafina para evitar la evaporación y se congelaron a -80°C hasta el momento de su utilización.

Los linfocitos totales se resuspendieron en Medio Hanks ajustándose su concentración a 2×10^6 células/ml con una cámara de Neubauer. Una vez descongeladas las placas de tipaje, con una microjeringa Hamilton (modelo 705N) provista de un dispensador automático (PB-600-1) se añadió 1 μ l de la suspensión de linfocitos a cada uno de los pocillos de la placa de tipaje, procurando que se mezclara bien con el antisuero. Las placas se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente, después de lo cual se añadieron 5 μ l por pocillo de complemento de conejo (preparado comercial del Instituto Behring) y se incubó a temperatura ambiente durante una hora más.

La lectura de las placas se realiza en fresco inmediatamente después de la incubación, en un microscopio invertido provisto de contraste de fase, determinándose los antisueros que matan las células. A partir de las especificidades contra las que van dirigidos estos antisueros se deduce el tipaje HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6 de los linfocitos.

(1) Incluidos un control positivo (suero antilinfocítico) y un control negativo (suero AB Rh⁺).

En algunas ocasiones las placas se fijaron y se leyeron tiempo después. En este caso, las células muertas se tiñeron con Eosina al 5% (5 μ l por pocillo) y después de unos segundos se fijaron con formaldehído 40% (10 μ l por pocillo). Las placas se conservaron en la nevera a 4°C hasta el momento de su lectura.

2.- TEST DE MICROCITOTOXICIDAD SOBRE ESPERMATOZOIDES

La suspensión de espermatozoides se ajustó a una concentración de $30-40 \times 10^6$ células/ml mediante una cámara de Neubauer. Para el conteo de los espermatozoides se mantuvieron las cámaras de Neubauer a 4°C durante unos minutos con objeto de paralizar los espermatozoides.

10 μ l de esta suspensión ($3-4 \times 10^5$ espermatozoides) se mezclaron con 10 μ l de antisero anti-HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6 (1) según el caso y se incubaron a 37°C durante 30 min, después de lo cual se añadieron 100 μ l de complemento de conejo y se incubó durante una hora más en las mismas condiciones, todo ello en tubos de plástico de 3ml.

Con objeto de distinguir los espermatozoides vivos de los muertos, se utilizó una técnica de doble fluorescencia consistente en el empleo de dos sustancias fluorescentes capaces de interaccionar con el DNA que difieren en sus propiedades de permeabilidad a través de la membrana biológica; Naranja de Acridina (fluorescencia verde) y Bromuro de Ethidio (fluorescencia roja), Festenstein et al. (1978).

Por ello, después de la incubación con el complemento se añadieron 7 μ l de una solución de Naranja de Acridina (1/10.000) + Bromuro de Ethidio (1/1000) (w/v). Se mezcló bien, y una alícuota de esta suspensión se montó en un portaobjetos y se utilizó para determinar el porcentaje de células muertas en un microscopio de fluorescencia.

(1) Los antiseros se utilizaron netos y fueron seleccionados entre aquellos que se utilizaban para el tipaje de tejidos y otros sueros locales previamente estudiados y de especificidad conocida. Como control negativo se utilizó suero AB Rh⁺.

En la fotografía se muestra una suspensión de espermatozoides después del tratamiento con un antisuero anti-HLA-A y complemento.

Los espermatozoides muertos por acción del complemento presentan poros en su membrana que permiten que el Bromuro de Ethidio penetre en el interior celular e interaccione con el DNA. Estos espermatozoides muertos aparecen teñidos con una coloración rojiza amarillenta en la fotografía. Los espermatozoides vivos impermeables al Bromuro de Ethidio aparecen teñidos de verde debido a la Naranja de Acridina, sustancia que permea libremente a través de la membrana biológica y que también interacciona con el DNA

Habitualmente se contaron más de 300 células por ensayo. El porcentaje de espermatozoides muertos se determinó según la fórmula:

$$\% = \frac{\% \text{ Espermatozoides muertos Test} - \% \text{ Espermatozoides muertos Control Neg.}}{100 - \% \text{ Espermatozoides muertos Control Neg.}} \times 100$$

3.- ANTISUEROS ANTI-HLA-A,-B,-C,-Bw4, Bw6 UTILIZADOS

MADRYC 41B (A3)	MADRYC 14 B (Aw24, +)
MADRYC 20B (A29, A2, +)	MADRYC 9 B (B5, Bw35, +)
MADRYC 28B (B18, B14, +)	Bw0SxD ⁰² ₀₃ (Cw4)
B10-112128 (Cw4)	VR 16986.2 (Bw4)
Bw0Sx F ⁰² ₀₃ (Cw3)	Hinchcliffe (Bw6)
SINCLAIR (A1)	SEVI 13 (A11)
GUILLESPIE (A1)	Bw 11 (A11)
FAIREY (A2)	JONES (A28)
HILSON (A2)	LEI-VR-ENG D (A28)
BAR 37 (A2 (A28))	Fe 71/32 (A29)
BERRY (A3)	CUNDALL (A29)
BAR 7283 (A3)	EMIN (A29)
THOMSON, Li (Aw23)	Fe 82/39 (Aw30, Cw5)
RODBRO (Aw23 (Bw44))	VR 24089-2 (Aw30)
KWCIA (Aw24)	MADISON (Aw30, B13)
FISHER AS (A1)	KR 4282 (Aw30, Aw31)
SEVI 50 (A9)	Fe 82/15 (Aw30)
MORGAN (Aw25)	MILL, GOK (Aw30, Aw31)
BAR 1 (Aw25)	THOMPSON (Aw31, Aw32, Aw33)

REID (Aw25, Aw26, Aw34)
TYLINSKY (Aw26)

BARI (A10)
BAR BA3 (Aw33)

CT 438 (Aw43)
A Y-355 (Bw52)

A Y-358 (Bw51)
WALKER (Bw51, B8)

WALES (Bw51, Bw52)
KAUR (Bw51, A11, A10)

SCHMIDT (Bw51, Bw52)
MADRYC 5B (Bw51, Bw35)

BURKE (B7)
FERRARA (B7, Bw22)

LACK (Bw22, Bw42, Bw54)
BINNS (B7, Bw22, Bw42, B7)

2WAAN VR 900 (B8)
SEVI 36 (B8)

CHAYRA (B8)
MADRYC 4B (Bw44, Bw45)

STRATTOW (Bw44)
LECHLEY (Bw44, Bw45)

MONEYWOOD (Bw44, Bw45)
KURSANDY (B13)

CASHMAN (B13)
CROFTS (B14)

ANTONIOU (B14)
CADJEAUX 497 (B15)

Fe 24/20 (B15)
Bw 15 (B15)

VR 265806 (Bw38, Bw39)
Fe 58/8 (Bw38, Bw39)

OVERDEVEST (Bw38, (Bw39))
VR 19643-7 (Bw38, Bw39)

SNITH KIM (B17-Cw6)
(B17-Cw3neg)

AY-376 (Bw60, Bw61, B13)

VALDERRIERE (Aw32, A10)
CT 435 (Aw32, Aw25)

Fe 93/7 (Aw33)
COSTER (B17, A2 (Aw28))

EAMES (B17)
TUFNELL (B17)

MADRYC 6B (B18)
Fe 42/32 (B18)

BAR 0842 (Bw49)
MI 4957 (Bw50 (Bw49))

Bw05x⁰²₀₃ (Bw49)

AFSMAR (Bw49, Bw50)

Bw05x⁰⁴₀₅ (B37)

AFSAR (Bw50, Bw45, Bw44, Bw41)
A4-354 (Bw54)

RsS 1079 (Bw22, A11)
Cc33 (Bw22, Aw30, B7)

Bw05w⁰⁸₀₉ (B5, Bw21)

MELNIKOF (Bw22, B7, Bw42)

Bw05w⁰²₀₃ (B 27)

DONNEY (Bw48)
N76 (B7, B27)

LEWIN (Bw51, Bw35)
CT 420 (Bw35)

PARTUOW (Bw35, Bw53)
ALB-SLA (Bw35)

Bw05w⁰⁴₀₅ (B5, Bw35)

DONNEY (B40)
CALDER (B40, Bw41, Bw47, Bw48)

TANSEY (B40, Bw48)
TYT 10400 (Bw37)

CAS 12551 (Bw47)
AY-126 (Bw48, B7, Bw60)

LUND (Cw4)
CLARKE (Cw3, +)

VR 19663.3 (Bw6, (B5, B27))

VR 1207.3 (Bw6, (B13))	HOBARD (Cw2, +)
EP10 (Bw6)	Fe 124116 (Cwl)
VR 23944.2 (Bw4, (Bw45))	AY 157 (Bw48, B 7, Bw60, Bw61)
VR12123.7 (Bw6, (B15.2))	BRAMA 1203 (Cw2)
MADRYC 2A EP53 (Cw5)	LEY-POLL-KA (Cw3)
MADRYC 2B (Cw5)	LEI-DONG (Cw4)
MADRYC 7B (Cw2)	4788 BRYSSON (Cw4 + Cw6)
BLANKES POOR (Cw4, Aw32, Aw25)	5211 JONES (Cw4 + Cw6)

DETERMINACION DE LOS ANTIGENOS HLA-DR

1.- TEST DE MICROCITOTOXICIDAD SOBRE LINFOCITOS B.

El tipaje HLA-DR se realizó de un modo similar al de los loci HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6. Los linfocitos B se resuspendieron en Medio Hanks y se ajustó su concentración a $2,5 \times 10^6$ células/ml.

Las placas de tipaje con la batería de sueros anti-HLA-DR se prepararon de modo similar a las de tipaje HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6 y se conservaron congeladas a -80°C hasta el momento de su utilización.

El tipaje se realizó en dos etapas. Se añadió un 1 μl de la suspensión celular a cada pocillo de la placa de tipaje utilizando una microjeringa Hamilton provista de un dispensador automático y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadieron 5 μl de complemento de conejo (preparado comercial del Instituto Behring) por pocilla y se incubó durante dos horas más en las mismas condiciones. Después de la incubación las placas de tipaje se fijaron con Eosina y Formaldehído tal y como se indicó anteriormente y se leyeron al día siguiente en un microscopio invertido provisto de contraste de fase, determinándose los sueros que mataban las células. A partir de las especificidades de estos sueros se deduce el tipaje HLA-DR.

2.- TEST DE MICROCITOTOXICIDAD SOBRE ESPERMATOZOIDES.

Se realizó de idéntica manera que para la detección de antígenos codificados por los loci HLA-A,-C,-B,-Bw4,Bw6 con la diferencia de que se aumentaron los tiempos de incubación a 45 y 90 min, respectivamente.

3. - ANTISUEROS ANTI-HLA-DR UTILIZADOS

WISS (1)	SEMINARD (3)	DOUCORET (5)
E460 (1)	BURGOS (3)	VEWET (5 + 8)
CANDRE (3)	CHERRY (3)	CHARBIT (5 + w6)
DUPRE (1)	Ly. THOMPSON (3 + 7)	KERDILES (w6 + (3 uv)
BETIN (2,7,5,3)	P6502C (3)	ODIOT (w6 + 2)
8w432 (1)	7w028 (3)	MADRYC 27B (1 + 2 + w6)
BEUREL (1)	MATHIEV 3013 (4)	PIERRE (7)
CAU (2)	BERNARD (4)	PELION (7)
MADRYC 168 (2)	DIARD (4)	VIOLTEL (7)
FIASTRE (2)	PETIT (4)	AMOUCHE (7)
G12 (2)	CAPELLE (4)	BASTON (7)
LERROY (2)	CAROLL (4)	DÉLVERRE (7)
TRENS (2)	PUGH (4x7)	ETIENNE (7)
BICHLER (3)	GIBASSIER (5)	DÉJEAN (7)
SUMMER (3)	3915A (5)	BCN-68 (7)
	LAMARQUE (5)	

ABSORCIONES

1.- ABSORCION EN ANTISUEROS DE LA ACTIVIDAD DIRIGIDA CONTRA ANTIGENOS TISULARES NO HLA.

Para la absorción de antisueros dirigidos contra antígenos tisulares no HLA se preparó un homogeneizado de un "pool" de 100 hígados de rata que se centrifugó a 1.000g durante 30 min a 4°C. Se recogió el sobrenadante y se centrifugó a 17.000g durante 30 min a 4°C. El sedimento de esta segunda centrifugación se lavó dos veces con 25 ml de PBS (pH 7,2) a 17.000g.

Después del último lavado se decantó completamente el sobrenadante y sobre el sedimento se añadió el antisuero a absorber en la proporción v/v, se mezcló bien y se mantuvo rotando a temperatura ambiente durante una hora y a 4°C durante toda la noche. El antisuero absorbido se separó por centrifugación a 17.000g durante 30 min a 4°C, se alicuotó en pequeños volúmenes, se congeló en N₂ líquido y se conservó a -80°C hasta el momento de su utilización.

2.- ABSORCIONES EN ANTISUEROS DE LA ACTIVIDAD ANTI-HLA.

Para las absorciones, los sueros anti-HLA se diluyeron con Media Hanks a la máxima dilución que mantenía el 100% de linfocitos muertos en test de microlinfocitotoxicidad ("end point").

La suspensión celular, con los antígenos HLA relevantes, que iba a ser utilizada en la absorción se resuspendió en el menor volumen posible y se determinó el número de células por μ l mediante dilución y conteo en una cámara de Neubauer. Distintas cantidades de esta suspensión con un número conocido de células se colocaron en tubos Beckman y se centrifugaron durante 5 min en una microcentrifuga Beckman. Los sedimentos se secaron cuidadosamente utilizando un capilar.

Se añadió el antisuero y se resuspendió el sedimento con él (1) (2).

(1) Parte del antisuero a absorber se mantuvo en las mismas condiciones experimentales, pero sin células o con células no relevantes, y constituyeron el control negativo de absorción o el de absorción inespecífico, respectivamente.

(2) En algunos experimentos el antisuero utilizado para la absorción se preparó mezclando 2 antisueros monoespecíficos de manera que una vez mezclados quedaran a una dilución final correspondiente al "end point" para cada una de las especificidades.

Después, los tubos se mantuvieron rotando 30 min a temperatura ambiente y 40 horas a 4°C. El antisuero absorbido se recuperó mediante centrifugación en la microcentrifuga Beckman durante 5 min, se alicuotó, se congeló en N₂ líquido y se conservó a -80°C.

Los antisueros absorbidos y sin absorber se testaron en un ensayo standard de microlinfocitotoxicidad, tal y como se señaló anteriormente, utilizando linfocitos del donante de las células utilizadas y linfocitos de otros individuos no relacionados. El control negativo fue siempre suero AB Rh⁺.

La actividad restante en los sueros se expresó como % de células muertas en el ensayo de microlinfocitotoxicidad según:

$$\% \text{ Células muertas} = \% \text{ Células muertas Test} - \% \text{ Células muertas Control Neg.}$$

En algunas ocasiones este % de células muertas se refirió al % de células muertas en el ensayo utilizando el suero sin absorber, según:

$$\% \text{ Ref. Suero sin Absorber} = \frac{\% \text{ Células muertas Test} - \% \text{ Células muertas Control Neg.}}{\% \text{ Células muertas suero sin Absorber} - \% \text{ Células muertas Control Neg.}} \times 100$$

DETECCION DE FACTOR B

1.- DETECCION DE FACTOR B

Para la detección de Factor B, se ha utilizado un ensayo hemolítico adaptado para determinar actividades de Factor B equivalentes a las existentes en el rango 0,1 μ l-1 μ l de un "pool" de sueros humanos normales.

El ensayo hemolítico se realizó en ausencia de Ca^{2+} , para bloquear la vía clásica de activación del complemento, y se basa en la activación de la vía alternativa del complemento por concentraciones elevadas de Mg^{2+} y/o por hematíes de conejo. Experimentalmente se puede conseguir un sistema deficiente exclusivamente de Factor B. Para ello, un "pool" de sueros humanos normales, utilizado como fuente de complemento, se privó de Factor B por calentamiento a 50°C durante 20 min. Lachmann y Hobart, 1978b.

Este suero privado de Factor B, en presencia de Mg^{2+} y ausencia de calcio, no es capaz de producir la lisis de los hematíes de conejo añadidos. Sin embargo, la adición de Factor B al sistema completa la secuencia y se produce la lisis de los hematíes. Esta lisis es dependiente de la cantidad de Factor B añadido.

La presencia de Factor B en la superficie celular puede ponerse de manifiesto de este modo. Para el caso de los espermatozoides la presencia de actividad de Factor B en su membrana completaría el sistema, produciéndose la lisis de los hematíes de conejo.

En las condiciones utilizadas en nuestro ensayo hemolítico, modificación del de Lachmann y Hobart (1978b) esta lisis es proporcional a la cantidad de Factor B equivalente a la existente en el rango 0,1 μ l-1 μ l de un "pool" de sueros humanos normales.

Ensayo:

Los espermatozoides purificados se lavaron en PBS (pH 7,2) y en cantidades crecientes se incubaron durante 1 hora a 37°C con 200 μ l de hematíes de conejo al 2% en PBS (EGTA 10mM, Mg^{2+} 7mM) pH 7,2 y 300 μ l de suero

humano privado de Factor B por calentamiento a 50°C durante 20 min y diluido 1/4 en PBS (EGTA 10mM, Mg^{2+} 7mM) pH 7,2. Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción añadiendo 66 μ l de PBS (EDTA 0,1M), se centrifugó a 1.600g y se determinó la cantidad de hemoglobina liberada al medio en el sobrenadante mediante absorción a 415nm. en un espectrofotómetro GILFORD-250.

Como control positivo se utilizaron linfocitos de enfermos con leucemia linfóide crónica (LLC) en cuya membrana se expresa el Factor B. Halbwachs y Lachmann (1976) (1). En los controles negativos se añadieron 66 μ l de PBS (EDTA 0,1M) antes de la incubación. Como controles adicionales, 1) se incubaron los hematíes solo con el suero privado de Factor B y 2) se incubaron los hematíes solo con la suspensión de linfocitos o de espermatozoides. Con lo que se descartó que en nuestras condiciones de trabajo la lisis de los hematíes se debiera al suero privado de Factor B; a los linfocitos, o a los espermatozoides, por separado.

En algunos experimentos los linfocitos (LLC) se incubaron previamente a la incubación en el ensayo con un antisero anti-Factor B (Immunostic, Seward Lab, U.K.), para lo cual se añadieron 50 μ l de antisero a la suspensión celular.

La hemólisis debida a la presencia de Factor B se determinó como la diferencia entre la encontrada en el ensayo y la encontrada en el control negativo.

Para cada experimento se construyó una curva patrón con distintas cantidades de un "pool" de sueros humanos normales. A esta curva se refirieron las actividades encontradas en los ensayos, determinándose las equivalencias para cada una de ellas a μ l del "pool" de sueros

(1) Una vez separados los linfocitos de la sangre de los enfermos con leucemia linfóide crónica (LLC) se lavaron exhaustivamente, descartándose que la actividad de Factor B detectada se debiera a arrastre del Factor B presente en el suero.

DETECCION DE DETERMINANTES HLA-D

1.- CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS (MLC) (1) (2)

- Preparación de las células homocigotas de tipaje (HTC) (3); tratamiento con Mitomicina C.

Los linfocitos utilizados como estimuladores del cultivo mixto (HTC), se descongelaron en un baño a 37°C y después de un lavado (10 ml; 400g; 10 min) con Medio de Congelación, con objeto de eliminar el DMSO, se resuspendieron a una concentración de $2-4 \times 10^6$ células/ml en Medio 199+0,025 mgr/ml de mitomicina C (Sigma, USA). Se incubaron en un baño a 37°C con agitación suave durante 30 min. Transcurrido este tiempo se lavaron tres veces con Medio 199 para eliminar la mitomicina C del medio (10 ml; 400g; 10 min) y se resuspendieron en Medio de Cultivo. Se estimó la viabilidad y número de los linfocitos mediante observación en una cámara de Neubauer. Se ajustó su concentración a $0,5 \times 10^6$ cel./ml.

- Preparación de los linfocitos respondedores

Los linfocitos a tipar en cultivo mixto se descongelaron por las técnicas habituales, después de los lavados se resuspendieron en Medio de Cultivo. Se estimó la viabilidad y número de los linfocitos y se ajustó su concentración a $0,5 \times 10^6$ células/ml.

- Organización de los cultivos

En cada experimento de tipaje se utilizaron 8-9 células homocigo-

(1) Mixed Lymphocyte Culture.

(2) Todas las operaciones en este tipo de experimentos con cultivos celulares se realizaron en condiciones estériles. Los medios se esterilizaron por filtración utilizando filtros Swinex (Millipore, Francia) con membranas de 0,22 de diámetro de poro. El material de vidrio se esterilizó en autoclave; el plástico con óxido de etileno. Se trabajó en una cámara Slee (Londres, U.K.) provista de flujo laminar.

(3) Homozygous Typing Cells.

tas de tipaje, HTC, correspondientes a igual número de especificidades HLA-D, como estimuladoras de los linfocitos de 30-35 individuos diferentes. Cada combinación se realizó por triplicado. Se incluyeron para cada célula estimuladora y para cada célula respondedora controles negativos y se comprobó la efectividad del tratamiento de las células estimuladoras con mitomicina C mediante la combinación en cultivo de las células estimuladoras entre sí.

El cultivo se realizó en placas de cultivo microtest (Sterilin) provistas de 96 pocillos con fondo de U y 250 μ l de capacidad. En cada pocillo se dispensaron 100 μ l de la suspensión de células homocigotas de tipaje (HTC) tratadas con mitomicina C (50.000 células/pocillo) y 100 μ l de la suspensión de linfocitos respondedores (50.000 células/pocillo).

Las placas se incubaron a 37°C bajo 5% CO₂ y humedad relativa del 95% en una estufa (Forma Scientific, Mod. 3156, Ohio, USA) provisto de control automático del % de CO₂ durante 5 días.

En el quinto día de cultivo se añadieron a cada pocillo 10 μ l (1 μ Ci) de ³H-Metil-Timidina (5Ci/mmol; 1mCi/10ml) (The Radiochemical Center, Amersham, U.K.) y se mantuvo durante otras 16 horas en la estufa.

Después de este tiempo de marcaje se filtraron los pocillos en un aparato especialmente diseñado para ello, "Harvester" (diseñado por H. Festenstein, The London Hospital) recogiendo las células en filtros Watman GF/A. Los filtros se lavaron exhaustivamente con agua destilada con objeto de lisar las células y de eliminar la timidina marcada libre.

Después de dejar secar los filtros, (50°C, 4 horas; temperatura ambiente, 24 horas) se colocaron en viales, se añadió a cada uno 4 ml de líquido de centelleo, y se determinó la cantidad de ³H-Metil-Timidina incorporada (cpm) mediante el conteo de la radioactividad presente en cada vial en un contador de centelleo líquido Intertecneque programado automáticamente para la detección de la radiación β correspondiente al ³H. La eficiencia del conteo fue de alrededor del 50%.

2.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los cpm correspondientes a cada combinación de la célula a tipar con las células homocigotas de tipaje (HTC) se han transformado en valores doblemente normalizados (DNV) (1), de acuerdo con el método de Mendell et al. (1978) modificación del de Ryder et al. (1975).

Descripción del método

Los resultados se prepararon como sigue:

- 1.- Determinar la mediana de los valores de cpm para todas las combinaciones estimulador-respondedor y para las respuestas autólogas.
- 2.- Realizar un análisis de todas las medianas de los valores de respuesta autólogos con objeto de determinar si alguno de estos valores es significativamente diferente del resto (2). Eliminar todas las células respondedoras que se encuentren en esta situación.
- 3.- Eliminar cualquier célula respondedora y cualquier estimuladora con menos de cuatro valores de respuesta (3), sin contar la respuesta autóloga.
- 4.- Repetir el punto 3 hasta que cada célula respondedora y estimuladora tenga al menos cuatro valores de respuesta.

Cálculo de DNV:

- 1.- Para cada respondedor, determinar el valor 75% de los valores de las

(1) Double Normalised Values

(2) Este cálculo se realizó aplicando la fórmula de Curtosis (b_2) para un nivel de significación del 5% según:

$$b_2 = \frac{n \left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x}) \right]^4}{\left[\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \right]^2} \quad \text{donde} \quad \bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \begin{array}{l} n: n^{\circ} \text{ respondedoras} \\ x_i: \text{mediana cpm} \\ \text{respondedor } i \end{array}$$

Tabla de significación del valor de b_2 en función de n , D'Agostino y Fjeitgen (1971)

- (3) Para un determinado experimento se eliminan aquellos valores de respuesta en los que las cpm no estén, al menos, duplicadas.

medianas de las cpm de respuesta observadas para el conjunto de las estimuladoras.

- 2.- Este valor 75% ha de ser al menos tres veces el valor de la mediana de la respuesta autóloga. Si no es así, eliminar la célula respondedora y repetir los puntos 3 y 4 de la preparación de datos. Repetir la etapa 1 de este apartado si es necesario.
- 3.- Calcular los valores normalizados de respuesta (RNV) (1) para cada combinación estimulador-respondedor.

Este RNV para un respondedor i y un estimulador j se calcula según:

$$RNV_{ij} = \frac{\text{Mediana cpm (respondedor i, estimulador j)}}{75\% \text{ respuesta (respondedor i)}} \times 100$$

- 4.- Calcular el valor 75% de los RNV para cada célula estimuladora.
- 5.- Calcular los valores doblemente normalizados (DNV) para cada combinación respondedor-estimulador según:

$$DNV_{ij} = \frac{RNV_{ij}}{75\% \text{ RNV (estimulador j)}} \times 100$$

3.- ASIGNACION DE ANTIGENOS.

Cada célula se tipó al menos dos veces con el juego completo de células homocigotas de tipaje (HTC) en experimentos separados.

El análisis del conjunto de todos los valores de respuesta (DNV) para cada célula homocigota se muestra en la figura A. Como puede observarse la distribución de los DNV para cada célula define bien una zona de respuesta de tipaje (cultivo mixto negativo), con un máximo en el intervalo de DNV entre 10-30 y una zona de no tipaje (cultivo mixto positivo) con un máximo entre 80-110; sin embargo, para las especificidades Dw3, Dw4, Dw5 y Dw7 aparecía un tercer tipo de respuesta en el intervalo 40-50 de asignación dudosa.

(1) Response Normalised Values.

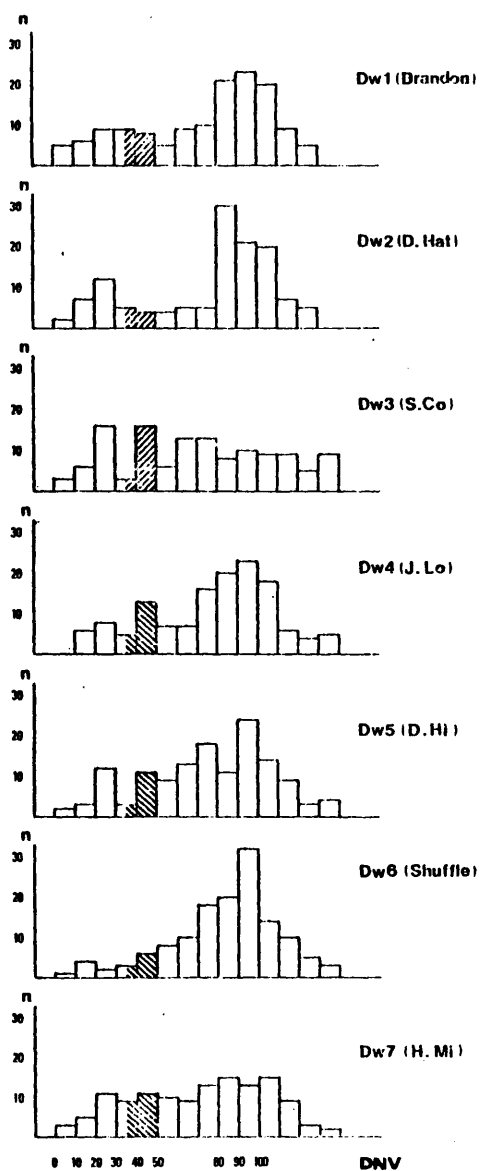


FIGURA A En la figura se muestra la distribución para cada célula de tipaje del conjunto de respuestas en los intervalos de DNV señalados en el eje de abscisas inferior. En ordenadas n representa el n° de respuestas para un determinado intervalo. La zona rayada, intervalo $35 < \text{DNV} \leq 50$, se corresponde con una respuesta de tipaje dudoso.

En función de estos resultados la asignación de los antígenos de las células a tipar se ha realizado según los siguientes criterios:

- 1.- $DNV \leq 35$ Respuesta de tipaje
 $DNV \leq 50$ Respuesta dudosa
 $DNV > 50$ Respuesta negativa de tipaje
- 2.- Para células con 2 DNV se ha asignado una determinada especificidad cuando al menos una respuesta era de tipaje y la otra dudosa; para células con 3 DNV, al menos cuando las tres respuestas eran dudosas.

4.- CELULAS HOMOCIGOTAS DE TIPAJE (HTC) UTILIZADAS

Las células homocigotas de tipaje (HTC) fueron cedidas amablemente por el profesor H. Festenstein (The London Hospital) y son los siguientes:

Brandon	Dw 1
D. Hat	Dw2
S. Co	Dw3
J. Lo	Dw4
D. Hi	Dw5
Shuffle	Dw6
H. Mi	Dw7
F.Pi (7w521)	Relacionada con Dw5
	DB3

Las células se mantuvieron congeladas en fase gaseosa de N_2 líquido hasta el momento de su utilización.

CULTIVOS MIXTOS ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS

1.- CULTIVOS MIXTOS ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS

Los espermatozoides se separaron y purificaron tal y como se describió anteriormente después de lo cual se resuspendieron en Medio de Cultivo a la concentración de 0,5, 1, 2,5, 5, ó 10×10^6 espermatozoides/ml dependiendo de los casos (1).

Las células respondedoras fueron las mismas que se utilizaron en los experimentos de tipaje del locus HLA-D (2), siendo el proceso de preparación idéntico al señalado entonces.

La organización de los cultivos se realizó de manera similar a los cultivos mixtos de linfocitos; 100 μ l de la suspensión de espermatozoides más 100 μ l de la suspensión de linfocitos respondedores se cultivaron por triplicado en una estufa a 37°C bajo 5% de CO₂ y 95% de humedad relativa, durante 4,5 ó 6 días. Transcurrido este tiempo se añadió 1 μ Ci de ³H-Metil-timidina (5 Ci/mmol; 1mCi/10ml) por pocillo y se incubó durante otras 16 horas.

La determinación de ³H-Metil-timidina incorporada se realizó de idéntico modo a como se señaló anteriormente para el cultivo de linfocitos.

En los experimentos se incluyeron un control negativo (autologo L.L)(3), un control de respuesta en el cultivo mixto autologo en el que se cultivaban linfocitos y espermatozoides pertenecientes al mismo individuo, y un control positivo (cultivo mixto L.Lmit.C) en el que los linfocitos respondedores se cultivaban con los linfocitos tratados con mitomicina C del donante de los espermatozoides.

Los % de estimulación se calcularon según la siguiente fórmula:

$$\% = \frac{M_{cpm} \text{ Cultivo mixto E/L} - M_{cpm} \text{ Cultivo Autologo L/L}}{M_{cpm} \text{ Cultivo Autologo L/L}} \times 100$$

donde Mcpm corresponde a la media de las cpm de los triplicados para cada combinación; E/L, espermatozoides/linfocitos; L/L, linfocitos/linfocitos.

(1) Los cultivos se aplicaron dentro de las 4 horas después de la obtención de la muestra.

(2) Ocasionalmente se utilizaron linfocitos frescos.

(3) Linfocitos respondedores solos

CULTIVO MIXTO CELULAS SEMINALES NO
ESPERMATOZOIDES (C.S.no E.) - LINFOCITOS

1.- CULTIVO MIXTO CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES (C.S. no E.)-
LINFOCITOS.

Las células seminales no espermatozoides obtenidas como se señaló anteriormente se resuspendieron después de los lavados en Medio de Cultivo, habitualmente a $0,5 \times 10^6$ células/ml.

Como células respondedoras se utilizaron los linfocitos de individuos que se habían empleado en los experimentos de tipaje HLA-D y en cultivos mixtos espermatozoides-linfocitos.

La organización de los cultivos se realizó de idéntica manera al del cultivo mixto espermatozoides-linfocitos señalado anteriormente. Normalmente ambos experimentos, cultivo mixto espermatozoides-linfocitos y cultivo mixto C.S. no E.-linfocitos, se realizaron simultáneamente.

Los % de estimulación se determinaron igual que para el caso del cultivo mixto espermatozoides-linfocitos.

En los experimentos se incluyeron cultivos mixtos autólogos en los que se cultivaron linfocitos y C.S. no E. del mismo individuo.

RESULTADOS

100

EXPRESION SELECTIVA DE PRODUCTOS

HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6 Y -DR EN ESPERMATOZOIDES

1.- SEROLOGIA HLA-A; PRESENCIA DE ANTÍGENOS HLA-A EN ESPERMATOZOIDES.

En la Tabla 1 se muestran los resultados de los experimentos de citotoxicidad sobre espermatozoides utilizando antisueros dirigidos contra antígenos del locus HLA-A.

Se utilizaron los antisueros: anti-HLA-A3 (MADRYC 41B), anti-HLA-Aw24 (MADRYC 14B) y anti-HLA-A29,A2 (MADRYC 20B). Como puede observarse los antisueros matan los espermatozoides de los individuos portadores de la especificidad HLA-A contra la que son dirigidos. El % de células muertas oscila alrededor del 33%. Los antisueros anti-HLA-A3 (MADRYC 41B) y anti-HLA-A29,A2 (MADRYC-20B) se ensayaron además sobre los espermatozoides de individuos que no poseían la especificidad contra la que iban dirigidos no pudiéndose detectar en estos casos diferencias significativas respecto a los controles negativos.

Previamente se habían realizado experimentos de citotoxicidad utilizando linfocitos de los donantes de los espermatozoides y otros linfocitos, comprobándose que los antisueros mataban solo y específicamente los linfocitos portadores de la especificidad HLA contra la que iban dirigidos.

Preparaciones de espermatozoides purificados de individuos HLA-A3 positivos o HLA-A2 positivos absorben apreciablemente las especificidades anti-HLA correspondientes de los sueros anti-HLA-A3 (MADRYC 41B) y anti-HLA-A2,A29 (MADRYC 20B) diluidos a su "end point". Sin embargo, los espermatozoides de un individuo HLA-A3 negativo no absorben esta especificidad del suero anti-HLA-A3 (MADRYC 41B). Tabla 2.

Esta absorción de antisueros anti-HLA-A por los espermatozoides se muestra dependiente del número de células empleadas. Figura 1. La actividad del suero anti-HLA-A3 (MADRYC 41B) se elimina progresivamente al aumentar el número de espermatozoides utilizado en la absorción. Este aumento en el número de espermatozoides no modifica significativamente la actividad del suero anti-HLA-Bw44,Bw45 (MADRYC 4B) dirigido contra antígenos extraños al donante de los espermatozoides. Similares resultados se obtuvieron para el suero anti-HLA-A2,A29 (MADRYC 20B).

Figura 2.

Se concluye, por tanto, que los espermatozoides tienen en su superficie antígenos HLA-A, demostrado todo ello tanto por citotoxicidad como por absorciones específicas.

% DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS EN ENSAYO DE CITOTOXICIDAD
UTILIZANDO SUEROS ANTI-HLA-A

FENOTIPO HLA DONANTE DE LOS ESPERMATOZOIDES	Anti-HLA-A3 (MADRYC 41B)	Anti-HLA-Aw24 (MADRYC 14B)	Anti-HLA-A29, A2 (MADRYC 20B)
Aw24, A3/B14, Bw35/Cw4/Bw6/DR5, DRw6	53,1	22,5 37,1	-
A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4/DR7	0	-	-
A1, A29/B37, Bw44/Bw4/DR7	-	-	41,9
A3, Aw23/B40, Bw35/Cw4/Bw6	22 35 30	-	-
A1, A2/Bw44, B17/Cw5/Bw4/DR4, DR7	0	-	19
Aw23, A11/Bw44, X/Cw4/Bw4/DR7, DR4	0	-	4,5
Aw30, A3/B18, Bw51/Cw1, Cw5/Bw4, Bw6/DR3	28,4	-	-
A1, Aw31/Bw44, B13/Bw4	0	-	-
A2, Aw24/Bw44, B18/Cw5/Bw4, Bw6/DR1, DR5	0	-	-

TABLA 1.- Los antisueros utilizados se usaron sin diluir. El % de espermatozoides muertos se calculó de acuerdo a como se señaló en Materiales y Métodos (pág.76).

**ABSORCION DE SUEROS ANTI-HLA-A CON PREPARACIONES DE
ESPERMATOZOIDES PURIFICADOS**

	FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL					
	A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	Aw24, A3/B14, Bw35/Cw4/Bw6	Aw30, A3/B18, Bw51/Cw1, Cw5/Bw4, Bw6	A3, Aw23/Bw35, B40/Cw4/Bw6
SUERO ANTI-HLA-A3 (MADRYC 418)(1/3) :						
- Sin Absorber	100	-	-	78,7	57,6	69,1
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:						
1) - A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	40	-	-	-	-	-
2) - A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	70	-	-	-	-	-
3) - A3, Aw24/B14, Bw35/Cw4/Bw6	-	-	-	25,1	21,1	23,9
SUERO ANTI-HLA-A2, A29(MADRYC 208)(1/10) :						
- Sin Absorber	86 95	93	90	-	-	-
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:						
1) - A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	-	30	57,5	-	-	-
2) - A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	63 69	61	-	-	-	-
3) - A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw4	-	0	0	-	-	-

TABLA 2.- En la Tabla se muestra la actividad restante en los sueros MADRYC 418 (A3) y MADRYC 208 (A2, A29), expresado como % de linfocitos muertos, después de la absorción con preparaciones de espermatozoides purificados y se compara con la actividad existente en los sueros sin absorber. La absorción se realizó en la proporción: 10×10^6 espermatozoides/ μ l de suero a absorber. Los sueros sin absorber se mantuvieron en las mismas condiciones experimentales. Los fenotipos HLA de los linfocitos utilizados se indican en la cabecera de cada columna.

ABSORCION DE UN SUERO ANTI-HLA-A3 (MADRYC 41B) Y DE
OTRO NO RELEVANTE (MADRYC 4B) CON CANTIDADES CRECIENTES DE ESPERMATOZOIDES.

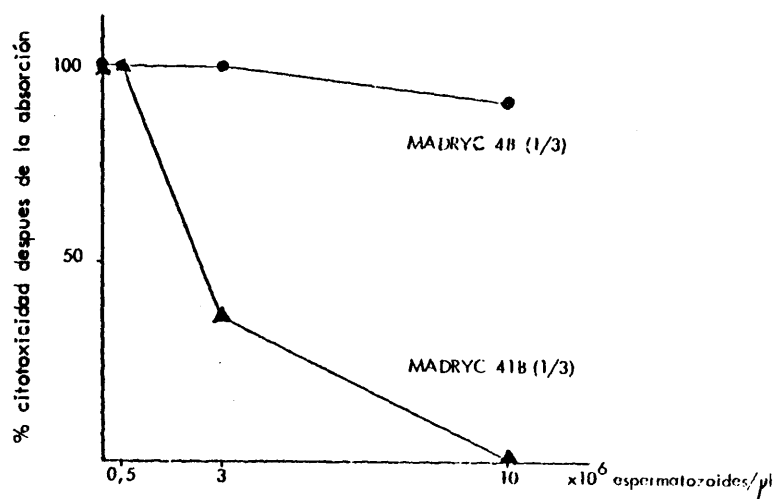


FIGURA 1.- Utilizando los espermatozoides de un individuo cuyo tipoje HLA era A3, Aw23/Bw35, B10/Cw4/Bw6 se absorbieron dos sueros anti-HLA diluidos a su "end point"; el suero MADRYC 4B es un anti-Bw44, Bw45 y el suero MADRYC 41B es un anti-A3. La absorción se realizó con cantidades crecientes de espermatozoides. La actividad restante en los sueros se ensayó para el caso del MADRYC 4B con linfocitos HLA-Bw44 positivos y para el MADRYC 41B con los linfocitos del donante de los espermatozoides. Las actividades restantes en los sueros se expresan como % de células muertas referidos al suero sin absorber.

ABSORCION DE SUEROS ANTI-HLA-A,-B Y -DR CON CANTIDADES
CRECIENTES DE ESPERMATOZOIDES.

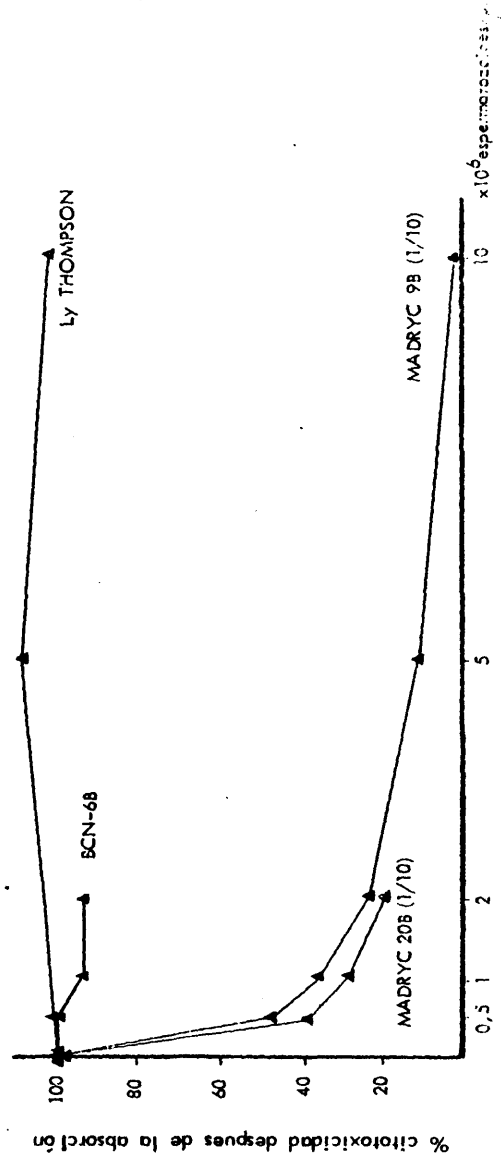


FIGURA 2.- La figura muestra un experimento similar al que se representa en la Figura 1. Los espermatozoides que se utilizaron en la absorción pertenecían a un individuo de fenotipo HLA A1,A2/Bw51,B*7/Cw6/Bw4/DR7. Las especificidades de los sueros y su dilución "end point" son: Ly Thompson (DR7, DR3) neto; BCN-68 (DR7) neto; MADRYC 98 (Bw51,w52,w35)(1/10)/MADRYC 208 (A2,A29) 1/10. Los sueros absorbidos y sin absorber se ensayaron sobre los linfocitos del donante de los espermatozoides. Para el caso de los sueros BCN-68 y Ly Thompson se utilizaron los linfocitos B. Los % de células muertas en el ensayo se refirieron a los % de células muertas en los sueros sin absorber.

2.- SEROLOGIA HLA-B; PRESENCIA DE ANTIGENOS HLA-B EN ESPERMATOZOIDES.

Se han utilizado tres antisueros que detectaban especificidades del locus HLA-B: anti-HLA-Bw51, Bw52, Bw35 (MADRYC 9B), anti-HLA-B18, B14 (MADRYC 28B) y anti-HLA-Bw44, Bw45 (MADRYC 4B). Estos antisueros mataban exclusivamente los linfocitos de los donantes de los espermatozoides utilizados que poseían especificidades HLA-B contra las que iban dirigidos.

En la Tabla 3 se muestran los resultados de los experimentos de citotoxicidad sobre espermatozoides utilizando estos antisueros. El suero anti-HLA-Bw51, Bw52, Bw35 (MADRYC 9B) mata los espermatozoides de individuos HLA-Bw51, Bw52 o Bw35 positivos, mientras que sobre otros espermatozoides el % de espermatozoides muertos no difiere apreciablemente de los controles negativos. El suero anti-HLA-Bw44, Bw45 (MADRYC 4B) mata los espermatozoides de los individuos HLA-Bw44 utilizados en los experimentos. Este suero (MADRYC 4B) mata el 13% y el 10%, respectivamente, de los espermatozoides de dos individuos B12 negativos. Sin embargo, en dos experimentos más sobre los espermatozoides del segundo individuo los resultados fueron claramente negativos. Como valor medio hay que señalar que los antisueros anti-HLA-B empleados matan alrededor del 33% de los espermatozoides de individuos que poseen la especificidad contra la que van dirigidos.

El suero anti-HLA-Bw44, Bw45 (MADRYC 4B) se diluyó 1/3 ("end point") y se absorbió con los espermatozoides purificados de individuos HLA-Bw44 positivos (dos individuos) y HLA-Bw44, Bw45 negativos (dos individuos). Tabla 4.

Cuando se examinó la actividad restante en los sueros absorbidos sobre un panel de linfocitos HLA-Bw44 positivos se observó que esta actividad había casi desaparecido en aquellos sueros que se habían absorbido con espermatozoides de individuos HLA-Bw44 positivos. La absorción con espermatozoides de individuos HLA-Bw44, Bw45 negativos no modifican significativamente la actividad del suero, tal como se ve cuando se compara con la del suero sin absorber.

Este mismo suero anti-HLA-Bw44, Bw45 (MADRYC 4B) diluido 1/3 se absorbió con los espermatozoides purificados de un individuo de fenotipo HLA

A2, Aw24/B18, Bw44/Cw5/Bw4, Bw6. Los antisueros absorbidos y sin absorber se titularon frente a los linfocitos del donante de los espermatozoides. Como puede observarse en la Figura 3 la absorción con espermatozoides disminuye apreciablemente el título del suero.

Otro anti-HLA-B, el antisuero anti-HLA-Bw51, Bw52, Bw35 (MADRYC 9B)(1/10), se absorbió con espermatozoides purificados de individuos Bw51 o Bw35 y con espermatozoides purificados de un individuo de fenotipo HLA A2, A3/37, 840 Cw3/Bw6. Tabla 5. La actividad restante en los sueros se ensayó sobre los linfocitos de los donantes de los espermatozoides y otros linfocitos no relacionados, y se comparó con la actividad presente en el suero sin absorber. Tabla 5.

Los espermatozoides de los individuos Bw51 o Bw35 positivos empleados absorben apreciablemente la actividad correspondiente del suero anti-Bw51, Bw52, Bw35 (MADRYC 9B). La absorción con los otros espermatozoides no relevantes no afecta sensiblemente la actividad anti-HLA-Bw51, Bw35 del suero MADRYC 9B.

La absorción de este suero anti-HLA-Bw51, Bw52, Bw35 (MADRYC 9B)(1/10) se muestra, por otro lado, dependiente del número de espermatozoides utilizados. Figura 2.

En la Tabla 6 se muestran los resultados de la absorción de un suero anti-HLA-B18, Bw44, Bw45 que se había preparado mezclando los antisueros MADRYC 6B (B18) y MADRYC 4B (Bw44, Bw45). La actividad anti-HLA-B18 se eliminaba cuando el suero se absorbía con los espermatozoides de un individuo B18 positivo, Bw44, Bw45 negativo y la actividad anti-HLA-Bw44 cuando la absorción se realizó con los espermatozoides de un individuo Bw44 positivo, B18 negativo. Estas absorciones no afectaban apreciablemente a la otra especificidad presente en el suero mezcla. Ello demuestra que las absorciones son debidas específicamente al antígeno HLA-B relevante presente en los espermatozoides puros y no son debidas a un efecto de dilución o neutralización inespecífica del suero por los espermatozoides.

Después de los experimentos analizados en el presente apartado se concluye que los espermatozoides llevan en su membrana antígenos HLA-B.

**% DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS EN ENSAYO DE CITOTOXICIDAD
UTILIZANDO SUEROS ANTI-HLA-B**

FENOTIPO HLA DONANTE DE LOS ESPERMATOZOIDES	Anti-HLA-Bw51, w52, w35 (MADRYC 9B)	Anti-HLA-B18, B14 (MADRYC 28B)	Anti-HLA-Bw44, Bw45 (MADRYC 4B)
Aw24, A3/B14, Bw35/Cw4/Bw6/DR5, DRw6	47,9 33,9 55,6	-	-
A1, A29/Bw44, B37/Bw4/DR7	-	-	60 40,7
A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4/DR7	21,3 27 30	-	-
A3, Aw30/B18, Bw51/Cw1, Cw5/Bw4, Bw6/DR3	27,8	38	-
A2, Aw25/B7, Bw52/Bw4, Bw6/DR2, DRw9	31,8 27,2	-	-
A3, Aw23/Bw35, B40/Cw4/Bw6	36,6 45,7	-	0 0 10,2
A2, Aw24/B18, Bw44/Cw5/Bw4, Bw6	0	-	23,3
A11, Aw23/Bw44, X/Cw4/Bw4	4,3	-	28

TABLA 3.- Los % que se muestran en la Tabla fueron calculados según se indicó en Materiales y Métodos (pág. 76). Los antisueros se utilizaron netos.

ABSORCION DE UN SUERO ANTI-HLA-B CON PREPARACIONES DE ESPERMATOZOIDES PURIFICADOS

FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL

A1, A29/Bw44, B37/Bw4
A1, Aw32/Bw44, B17/Cw6/Bw4, Bw6
A2, A29/Bw44, B17/Bw4
A3, A29/Bw44, B17/Bw4
A1, Aw31/Bw44, B13/Dw4
A11, Aw23/Bw44, X/Cw4/Bw4
A2, Aw24/Bw44, Bw52/Cw5/Bw4
A29, X/Bw44, X/Bw4

SUERO ANTI-HLA-Bw41, Bw45 (MADRYC 4B)(1/3) :

- Sin Absorber
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:
 - 1) - A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4
 - 2) - A11, Aw25/Bw44, X/Cw4/Bw4
 - 3) - A1, A29/Bw44, B37/Bw4
 - 4) - A2, A11/Bw52, B18/Cw5, Cw1/Bw4, Bw6 ...

100	100	80	100	70	100	90	100
-	-	65	45	45	100	65	80
-	-	0	0	0	25	25	25
0	0	-	-	-	-	-	-
100	100	-	-	-	-	-	-

TABLA 4.- El suero MADRYC 4B (Bw44, Bw45), diluido a su "end point" (1/3), se absorbio en la proporcion 10x10⁶ espermatozoides/ μ l de suero, con los espermatozoides de individuos Bw44 positivos o Bw44 negativos, y se determino la actividad Bw44 restante mediante las tecnicas habituales frente a un panel de linfocitos Bw44 positivos. Los valores representan el % de celulas muertas en el ensayo.

TITULACION DE UN SUERO ANTI HLA-B SIN ABSORBER
Y ABSORBIDO CON ESPERMATOZOIDES.

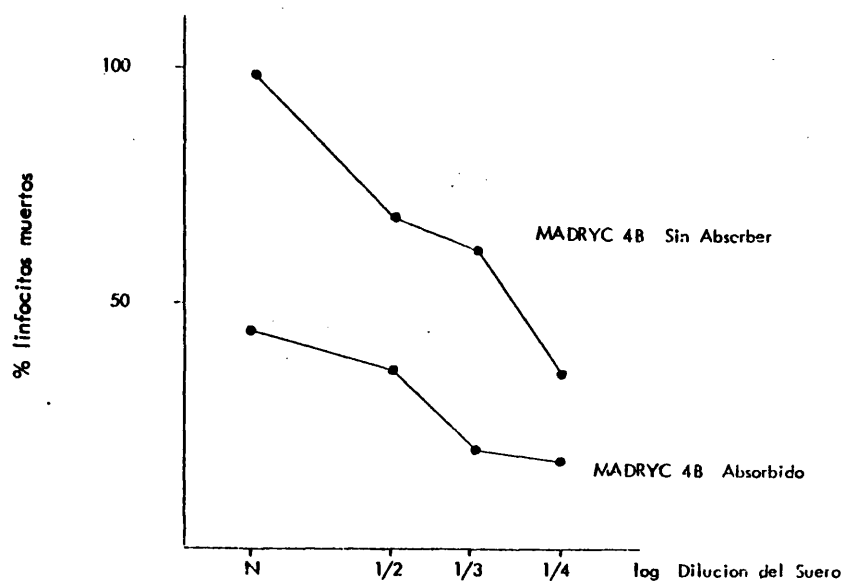


FIGURA 3.- El suero anti-HLA-Bw44, Bw45 (MADRYC 4B) (1/3), absorbido con espermatozoides de un individuo Bw44 positivo, y sin absorber, se titulan por diluciones progresivas con Medio Hanks frente a linfocitos del donante de los espermatozoides. En la Figura se muestran los % de células muertas en el ensayo para cada dilución de ambos sueros.



ABSORCION DE UN SUERO ANTI HLA-B CON PREPARACIONES
DE ESPERMATOZOIDES PURIFICADOS

	FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL		
	A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	A3, Aw24/B14, Bw35/Cw4/Bw6	A3, Aw23/Bw35, B40/Cw4/Bw6
SUERO ANTI-HLA-Bw51, w52, w35 (MADRYC 9B)(1/10) :			
- Sin Absorber	100	100	100
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:	90		
1) - A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	34,9	-	-
	47,8		
2) - A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	84,8	-	-
3) - Aw24, A3/B14, Bw35/Cw4/Bw6	-	8,2	10

TABLA 5.- La absorción se realizó en la proporción 10×10^6 espermatozoides/ μ l de suero a absorber. Los fenotipos de los linfocitos utilizados en el ensayo de la actividad restante se muestran en la cabecera de cada columna. Estas actividades se expresan como % de células muertas en el ensayo.

ABSORCION ESPECIFICA DE ACTIVIDADES ANTI-HLA-B
CON PREPARACIONES DE ESPERMATOZOIDES

	FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL			
	Aw26, Aw32/B18, Bw51/Cw5/Bw4, Bw6	A3, Aw30/B18, Bw51/Cw1, Cw5/Bw4, Bw6	A1, Aw31/Bw44, B13/Bw4	A1, A29/Bw44, B37/Bw4
SUERO MEZCLA (MADRYC 4B; Bw44, Bw45) (MADRYC 6B; B18) :				
- Sin Absorber	70	70	100	80
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:				
1)- A1, A29/Bw44, B37/Bw4	50	70	25	0
2)- A3, Aw30/B18, Bw51/Cw1, Cw5/Bw4, Bw6	0	0	100	80

TABLA 6.- El suero se preparó mezclando dos antisueros, MADRYC 4B (Bw44, Bw45) y MADRYC 6B (B18) en la proporción 1:2, resultando a una dilución final correspondiente a las diluciones "end point" para cada suero. La absorción se realizó en la proporción 10×10^6 espermatozoides/ μ l de suero. Los sueros absorbidos con espermatozoides o sin absorber se ensayaron frente a un panel de linfocitos Bw44 positivos o B18 positivos constituido por los linfocitos de los donantes de los espermatozoides y linfocitos de otros individuos no relacionados. Los valores representan el % de células muertas en el ensayo.

3.- PRESENCIA DE ACTIVIDAD ANTI-ESPERMATOZOIDES EN SUEROS ANTI-HLA-A Y ANTI-HLA-B.

Los sueros MADRYC 9B (Bw51, Bw52, Bw35), MADRYC 41B (A3) y MADRYC 4B (Bw44, Bw45) se ensayaron sobre espermatozoides en experimentos preliminares y resultó que mataban inespecíficamente los espermatozoides de individuos que eran positivos o no para la especificidad contra la que iban dirigidos. Esta inespecificidad no aparecía cuando los sueros se ensayaban sobre los linfocitos de los donantes de los espermatozoides.

Esta inespecificidad sobre espermatozoides se eliminaba cuando los sueros se absorbían con una preparación de membranas de hígado de rata purificadas (1), como se muestra en la Tabla 7. En el experimento que se muestra hay que señalar que el suero anti-Bw44, Bw45 (MADRYC 4B) absorbido con la preparación de membranas no mata apreciablemente los espermatozoides de uno de los individuos Bw44 positivos. El 28% de los espermatozoides de un individuo de fenotipo HLA Aw23, A11/Bw44, X/Cw4/Bw4 son matadas por el antisuero anti-HLA-A3 (MADRYC 41B) absorbido. HLA-A11 y HLA-A3 muestran por otro lado una fuerte reacción cruzada.

Se deduce que existe actividad anti-espermatozoides en algunos sueros anti-HLA; esta actividad se puede eliminar mediante absorciones con extractos de hígado de rata. Este método de absorción de actividad tisular inespecífica ha sido utilizado en inmunología desde hace tiempo para eliminar tinciones inespecíficas en inmunofluorescencia de auto-anticuerpos.

(1) La absorción con la preparación de membranas de hígado de rata no afecta a la actividad anti-HLA de los sueros según pudo comprobarse cuando estos sueros anti-HLA absorbidos se ensayaron sobre un panel de linfocitos HLA-A3, Bw35, Bw51, Bw52 ó Bw44 positivos. Esta actividad anti-HLA, sin embargo, era eliminada totalmente cuando estos linfocitos se utilizaban en la absorción. Los sueros absorbidos exclusivamente con linfocitos (no absorbidos con la preparación de membranas) seguían siendo inespecíficamente citotóxicos para los espermatozoides.

ABSORCION DE ANTICUERPOS NO ANTI-HLA EN 3 SUEROS ANTI-HLA

FENOTIPO HLA DONANTE DE LOS ESPERMATOZOIDES :	Anti-HLA-Bw51, w52, w35 (MADRYC 9B)		Anti-HLA-A3 (MADRYC 41B)		Anti-HLA-Bw44, Bw45 (MADRYC 4B)	
	Sin Absorber	Absorbido	Sin Absorber	Absorbido	Sin Absorber	Absorbido
A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4/DR7	56	21,3	100	0	47	3
A3, Aw23/Bw35, B40/Cw4/Bw6	-	27,2	-	22	-	10,2
A11, Aw23/Bw44, X/Cw4/Bw4	100	16,8	100	28	90	28
A3, Aw30/B18, Bw51/Cw1, Cw5, Bw4, Bw6	54,5	27,8	86,7	28,4	75,2	0
A1, Aw31/Bw44, B13/Bw4	35	0	68	0	79	5
A2, Aw24/Bw44, B18/Cw5/Bw4, Bw6	29,9	0	72,4	0	89,5	23,2

TABLA 7.- En la Tabla se muestra el % de espermatozoides muertos en test de citotoxicidad para los sueros MADRYC 9B, MADRYC 41B y MADRYC 4B absorbidos y sin absorber con una preparación de membranas de hígado de rata. Los sueros se ensayaron frente a los espermatozoides de individuos que poseían o no la especificidad contra la que iban dirigidos.

4.- SEROLOGIA HLA-C; AUSENCIA DE ANTIGENOS HLA-C EN ESPERMATOZOIDES.

Ninguno de los tres sueros anti-HLA-C, Bw05xD₀₃⁰² (Cw4), BIO-112128 (Cw4) o MADRYC 2B (Cw5) mata apreciablemente los espermatozoides de individuos Cw4 o Cw5 positivos respectivamente. Tabla 8. Estos sueros mataban los linfocitos de los donantes de los espermatozoides que poseían la especificidad correspondiente, y en concreto el Bw05xD₀₃⁰² (Cw4) mataba el 100% de los linfocitos Cw4 positivos a una dilución de hasta 1/10 ("end point").

La actividad restante en los sueros Bw05xD₀₃⁰² (Cw4) (1/10), MADRYC 2B (Cw5) y Bw05xF₀₃⁰² (Cw3) (1/2) absorbidos con espermatozoides de individuos que poseían las especificidades correspondientes se ensayó frente a linfocitos de los donantes de los espermatozoides y se comparó con la actividad en el suero sin absorber. Estos resultados se muestran en la Tabla 9. Como puede observarse la actividad no se modifica por la absorción con espermatozoides. El suero Bw05xD₀₃⁰² (Cw4) (1/10) tampoco se absorbe con los espermatozoides de un individuo Cw6 positivo.

Se concluye que no existen moléculas HLA-C en la superficie de espermatozoides purificados, de acuerdo con los experimentos de citotoxicidad directa y absorción efectuados por nosotros.

% DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS EN ENSAYO DE CITOTOXICIDAD
UTILIZANDO SUEROS ANTI-HLA C

FENOTIPO HLA DONANTES DE LOS ESPERMATOZOIDES :	Anti-HLA-Cw4 (Bw05x03) C2	Anti-HLA-Cw4 (B10-112128)	Anti-HLA-Cw5 (MADRYC 2B)
A3, Aw24/B14, Bw35/Cw4/Bw6/DR5, DRw6	10 10,3	2,7	-
A3, Aw30/B18, Bw51/Cw1, Cw5/Bw4, Bw6	-	-	0
A3, Aw23/B40, Bw35/Cw4/Bw6	0 0	-	-
Aw23, A11/Bw44, X/Cw4/Bw4	0	-	-

TABLA 8.- En los experimentos los sueros se utilizaron netos. El % se calculó según se indicó en Materiales y Métodos (pág.76). Como control positivo se utilizaron antisueros anti-HLA-A o anti-HLA-B utilizados en otras ocasiones y que mataban los espermatozoides.

NO ABSORCION DE SUEROS ANTI-HLA-C POR PREPARACIONES
PURIFICADAS DE ESPERMATOZOIDES

	FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL				
	A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	A3, Aw23/Bw35, B40/Cw4/Bw6	A3, Aw24/B14, Bw35/Cw4/Bw6	Aw24, A2/Bw44, B18/Cw5/Bw4, Bw6	A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6
SUERO ANTI-HLA-Cw4 (Bw05xD ₀₃ ⁰²) (1/10) :					
- Sin Absorber	76	85	80	-	-
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:					
1) A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	77,6	86,8	80	-	-
2) A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	62	75,5	65	-	-
SUERO ANTI-HLA-Cw5 (MADRYC 2B) :					
- Sin Absorber	-	-	-	43,8	-
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:					
1) Aw24, A2/Bw44, B18/Cw5/Bw4, Bw6 ...	-	-	-	45,2	-
SUERO ANTI-HLA-Cw3 (Bw05xF ₀₃ ⁰²) (1/2) :					
- Sin Absorber	-	-	-	-	80
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:					
1) A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	-	-	-	-	80

TABLA 9.- La absorción se realizó en la proporción 10×10^6 espermatozoides/ μ l de suero a absorber. Las actividades restantes se representan como % de linfocitos muertos en el ensayo de microlinfocitotoxicidad.

5.- SEROLOGIA HLA-Bw4, Bw6; AUSENCIA DE ANTIGENOS Bw4, Bw6 EN ESPERMATOZOIDES.

Tres sueros anti-HLA-Bw4 (VR-12123.7, VR-16986.2 y VR-23944.2) y dos anti-HLA-Bw6 (HINCHCLIFFE, y VR-1207.2) se ensayaron en experimentos de citotoxicidad frente a los espermatozoides de individuos Bw4 positivos o Bw6 positivos, según los casos. Tabla 10. Los % de espermatozoides muertos no diferían significativamente de los controles negativos utilizando en lugar de antisuero suero AB Rh⁺. Los sueros, que se utilizaron netos en los experimentos, mataban los linfocitos de los individuos donantes de los espermatozoides. El suero HINCHCLIFFE tiene un título sobre linfocitos Bw6, Bw6 de 1/20.

La absorción de los sueros HINCHCLIFFE (Bw6) (1/20) y VR-16986.2 (Bw4) con espermatozoides de individuos Bw6 o Bw4 positivos, respectivamente, no afecta a la actividad de los sueros, como se observó al testar la actividad restante sobre linfocitos Bw6 o Bw4 positivos. Tabla 11.

Se deduce que no existen antígenos o determinantes Bw4, Bw6 en la superficie de los espermatozoides.

% DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS EN ENSAYO DE CITOTOXICIDAD
UTILIZANDO SUEROS ANTI-HLA-Bw4, Bw6.

FENOTIPO HLA DONANTES DE LOS ESPERMATOZOIDES :	Anti-HLA-Bw4 (VR 12123.7)	Anti-HLA-Bw4 (VR 16996.2)	Anti-HLA-Bw4 (VR 23944)	Anti-HLA-Bw6 (HINCHCLIFFE)	Anti-HLA-Bw6 (VR 1207.2)
A3, Aw24/B14, Bw35/Cw4/Bw6/DR5	-	-	-	2,3 0	-
A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4/DR7	0	0	7,6	-	-
A3, Aw23/B10, Bw35/Cw4/Bw6	-	-	-	0	0
A9, A29/B18, Bw51/Cw1/Bw6/DR2, DR5	-	-	-	0	0
A1, A2/Bw44, B17/Cw5/Bw4	0	-	-	-	-
A11, Aw23/Bw44, X/Cw4/Bw4	0	0	-	-	-

TABLA 10.- Como controles positivos en estos experimentos se utilizaron sueros anti-HLA-A o anti-HLA-B usados en otras ocasiones y que mataban los espermatozoides. El % de citotoxicidad se calculó según se describe en Materiales y Métodos(pág. 76).

NO ABSORCION DE SUEROS ANTI-HLA-Bw4, Bw6 POR PREPARACIONES
PURIFICADAS DE ESPERMATOZOIDES

FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL

	A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	A3, Aw23/Bw35, B40/Cw4/Bw6	A2, Aw32/Bw35, B14/Cw4/Bw6	A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4
SUERO ANTI-HLA-Bw6 (HINCHCLIFFE)(1/20) :				
- Sin Absorber	100 100	90	90	-
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:				
1) - A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	100 90	-	-	-
2) - A2, Aw32/Bw35, B14/Cw4/Bw6	100 100	80	80	
3) - A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	95	-	-	-
SUERO ANTI-HLA-Bw4 (VR 16936.2) :				
- Sin Absorber	-	-	-	95
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:				
1) - A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	-	-	-	85

TABLA 11.- En la Tabla se representan las actividades restantes en los sueros como % de linfocitos muertos en ensayo de microlinfocitotoxicidad. Los sueros se absorbieron en la proporción 10×10^6 espermatozoides/ μ l suero a absorber.

6.- SUEROS ANTI-HLA POLIESPECIFICOS.

Un suero, SEVI 61, mataba los espermatozoides de todos los individuos BW4 positivos que se ensayaron en experimentos preliminares.

La absorción de este suero con los espermatozoides de dos individuos de fenotipo HLA A1,A2/B17,Bw51/Cw6/Bw4 y Aw23,A11/Bw44,X/Cw4/Bw4 eliminaba específicamente la citotoxicidad de este suero hacia un panel de linfocitos B17 positivos o Bw44 positivos, respectivamente, que también eran Bw4 positivos. Tabla 12. Ello demostró que este suero contiene una mezcla de anticuerpos contra antígenos del locus HLA-B y no contra determinantes Bw4. La absorción específica por los espermatozoides de anticuerpos anti-HLA-B y no de anti-Bw4,Bw6 puede servir para la, a menudo, difícil tarea de distinguir serológicamente antisueros anti-Bw4,Bw6 de otros poliespecíficos anti-HLA-B.

ABSORCION DEL SUERO SEVI 61 CON PREPARACIONES
PURIFICADAS DE ESPERMATOZOIDES

SUERO SEVI 61 (1/15) :	FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL					
	A11, Aw23/Bw44, X/Cw4/Bw4	A1, Aw31/Bw44, B13/Bw4	A3, A29/Bw44, B17/Bw4	A2, Aw30/B27, B17/Bw4	A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	A9, Aw32/Bw51, B17/Bw4
- Sin Absorber	80	70	80	80	80	100
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:						
1) - A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	70	70	30	0	0	30
2) - Aw23, A11/Bw44, X/Cw4/Bw4	40	0	40	70	50	80

TABLA 12.- El suero SEVI 61 se utilizó en la absorción diluido 1/15 ("end point"). La absorción se realizó en la proporción 10×10^6 espermatozoides/ μ l suero. El suero absorbido o sin absorber se testó frente a un panel de células Bw44 y/o B17 positivas. Se representa el % de linfocitos muertos en el ensayo.

7.- SEROLOGIA HLA-DR; AUSENCIA DE ANTIGENOS HLA-DR EN ESPERMATOZOI-
DES.

En la Tabla 13 se muestra el conjunto de los experimentos de citotoxicidad sobre espermatozoides utilizando antisueros anti-HLA-DR. Ninguno de los cuatro antisueros utilizados mata apreciablemente los espermatozoides de individuos que poseen la especificidad correspondiente. El suero anti-HLA-DR7 (BCN-6B) mata el 7,8% y el 11,4% en dos experimentos repetidos sobre los espermatozoides de un individuo DR7 positivo. Estos espermatozoides son matados asimismo, 1,6% y 7,3%, por un antisuero anti-DR2 (MADRYC 16B), especificidad que no posee el donante de los espermatozoides. Ello puede ser debido a actividad anti-HLA-A o -B residual (Véase discusión, pág. 192).

Los antisueros utilizados mataban, en ensayo de microlinfocito-toxicidad, los linfocitos B de los donantes de los espermatozoides.

Los sueros BCN-6B (DR7), LAMARQUE (DR5) y BEUREL (DR1) se absorbieron con los espermatozoides de individuos que poseían las especificidades HLA-DR correspondientes. Los sueros absorbidos se titularon junto con los sueros sin absorber con los linfocitos B de los donantes de los espermatozoides, no encontrándose diferencias apreciables entre ambos sueros, absorbidos y sin absorber. Figura 4.

Los antisueros anti-HLA-DR, BCN-6B (DR7) y Ly Thompson (DR7+DR3) se absorbieron, por otro lado, con cantidades crecientes de espermatozoides de un individuo de fenotipo HLA A1,A2/B17,Bw51/Cw6/Bw4/DR7 (Figura 2), no encontrándose disminución en la actividad del suero absorbido cuando se testó sobre los linfocitos B del donante de los espermatozoides. Estos mismos espermatozoides absorbían, en el mismo experimento, las actividades correspondientes de los sueros anti-Bw51,w52,w35 (MADRYC 9B) y anti-HLA-A2,A29 (MADRYC 20B).

Se comprueba, por tanto, que por citotoxicidad y absorción con espermatozoides puros, no se detecta HLA-DR en la superficie de los espermatozoides.

% DE ESPERMATOZOIDES MUERTOS EN ENSAYO DE CITOTOXICIDAD
UTILIZANDO SUEROS ANTI-HLA-DR

FENOTIPO HLA DONANTES DE LOS ESPERMATOZOIDES :	Anti-HLA-DR2 (MADRYC 168)	Anti-HLA-DR1 (MADRYC 278)	Anti-HLA-DR7 (BCN-6B)	Anti-HLA-DR5 (DOUCORET)
A3, Aw24/B14, Bw35/Cw4/Bw6/DR5, DRw6	-	-	-	0
A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4/DR7	1,6 7,3	-	7,8 11,4	-
A1, A29/Bw44, B37/Bw4/DR7	-	-	2,2	-
A2, Aw25/Bw52, B7/Bw4, Bw6/DR2, DRw9	0	-	-	-
A9, A29/B18, Bw51/Cw1/Bw6/DR2, DR5/DC-1	0	0	-	0

TABLA 13.- Los sueros se utilizaron netos. El % se calculó según se indica en Materiales y Métodos. Como control positivo se utilizó un antisuero anti-HLA-A o anti-HLA-B de los mencionados anteriormente y que reaccionaba positivamente con los espermatozoides.

**TITULACION DE SUEROS ANTI-HLA-DR ABSORBIDOS Y SIN
ABSORBER CON PREPARACIONES DE ESPERMATOZOIDES.**

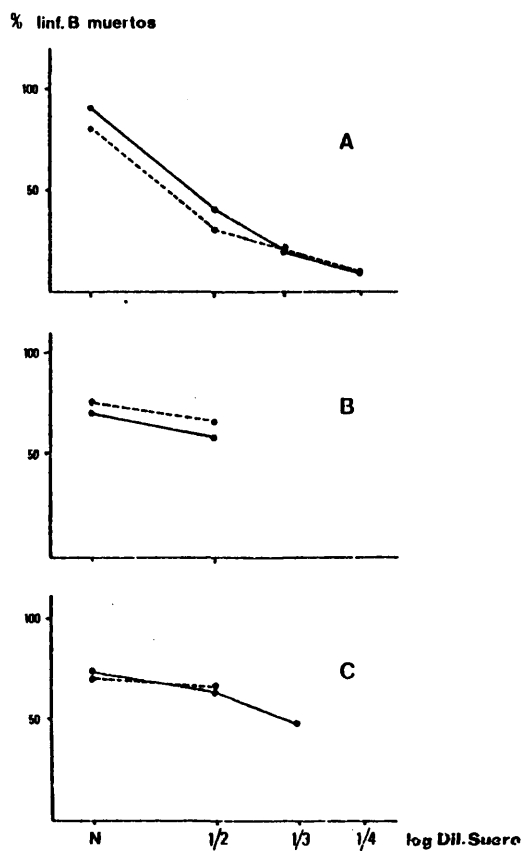


FIGURA 4.- Las figuras representan los % de linfocitos B muertos en ensayo de citotoxicidad de los sueros que se indican a las diluciones que se señalan. Las líneas continuas corresponden a los sueros sin absorber, las líneas interrumpidas corresponden a los sueros absorbidos con los espermatozoides de individuos que poseen la especificidad HLA-DR correspondiente al suero utilizado. Los linfocitos B utilizados en el ensayo fueron los de los donantes de los espermatozoides. La absorción se realizó en la proporción 10×10^6 espermatozoides/ μ l suero a absorber.

- A) Suero BCN-6B (DR7) absorbido con los espermatozoides de un individuo A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4/DR7 y BCN-6B (DR7) sin absorber.
 B) Suero BEUREL (DR1) absorbido con los espermatozoides de un individuo A2, Aw24/Bw44, B18/Cw5/Bw4, Bw6/DR1, DR5 y BEUREL (DR1) sin absorber.
 C) Suero LAMARQUE (DR5) absorbido con los espermatozoides de un individuo A2, Aw24/Bw44, b16/Cw5/Bw4, Bw6/DR5, DR1 y LAMARQUE (DR5) sin absorber.

123

EXPRESION DE ANTIGENOS HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6
EN CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES.

1.- EXPRESION DE ANTIGENOS HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6 EN CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES.

A) HLA-A

El suero anti-HLA-A2,A29 (MADRYC 20B): (1/10) se absorbió con los espermatozoides purificados, células seminales totales (espermatozoides más otras células seminales) y linfocitos de tres individuos HLA-A2 positivos. Las actividades restantes en los sueros se ensayaron sobre los linfocitos de los mismos individuos. Tabla 14. Como puede observarse, tanto los linfocitos como las células seminales totales absorben por completo la actividad anti-HLA-A2 del suero MADRYC 20B (1/10). Los espermatozoides purificados del individuo A2,A3/B7,B40/Cw3/Bw6 absorben aproximadamente el 30%, los del individuo A1,A2/B17,Bw51/Cw6/Bw4 un poco más y los del individuo A2,Aw32/B14,Bw35/Cw4/Bw6 la totalidad de la actividad anti-HLA-A2 presente en el suero MADRYC 20B (1/10). Por tanto, existen antígenos HLA-A en células seminales no espermatozoides (véase discusión pág.182).

B) HLA-B

La actividad anti-HLA-Bw51 disminuye en un 65% cuando el suero MADRYC 9B (1/10) se absorbe con los espermatozoides purificados de un individuo Bw51 positivo. La absorción de este suero con células seminales totales o con linfocitos de este mismo individuo elimina casi completamente esta actividad. Tabla 15. Estas mismas absorciones realizadas con célula de un individuo negativo para las especificidades contra las que va dirigido el suero MADRYC 9B no afectan, en ningún caso, a la actividad del suero. Como en el apartado anterior, se concluye que además de los espermatozoides, otras células seminales tienen antígenos HLA-B (véase discusión pág.182).

C) HLA-C

La actividad del suero anti-HLA-Cw4 (Bw05xD⁰²₀₃) no se afecta sensiblemente después de la absorción con los espermatozoides purificados de un individuo Cw4 positivo o de un individuo Cw6 positivo. Esta actividad anti-HLA-Cw4 es eliminada, sin embargo, cuando se utilizaban células seminales totales o linfocitos del individuo Cw4 positivo y disminuía sensiblemente cuando eran las células del individuo Cw6 positivo las que se utilizaban en la absorción. Tabla 16. HLA-Cw4 y HLA-Cw6 muestran, por otro lado, reacción cruzada y los anticuerpos presentes en el suero Bw05xD⁰²₀₃ pueden detectar determinantes comunes a Cw4 y Cw6.

Se concluye que no se detecta antígeno HLA-Cw4 en espermatozoides (véase resultados pág. 116) y que otras células seminales presentan este antígeno en superficie (véase discusión, pág. 183).

D) HLA-Bw4, Bw6

El suero HINCHCLIFFE (Bw6) (1/15) no se absorbe con preparaciones purificadas de los espermatozoides de un individuo Bw6 positivo. Sin embargo, esta actividad anti-Bw6 se absorbe casi totalmente cuando se utilizan las células seminales totales en la absorción. Los linfocitos absorben completamente la actividad del suero HINCHCLIFFE (Bw6). Tabla 17. La actividad anti-Bw6 presente en el suero no se modificó apreciablemente cuando se utilizaron las células de un individuo Bw6 negativo para la absorción.

Se deduce que Bw6 no se expresa en espermatozoides (véase resultados pág. 119) y si en otras células seminales (véase discusión pág. 183).

**ABSORCION DE UN SUERO ANTI-HLA-A CON DISTINTAS PREPARACIONES
DE CELULAS SEMINALES Y LINFOCITOS DE INDIVIDUOS HLA-A2**

	FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL		
	A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	A2, Aw32/Bw35, B14/Cw4/Bw6
SUERO ANTI-HLA-A2, A29 (MADRYC 20B)(1/10) :			
- Sin Absorber	86	90	90
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:			
1) A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	63	61	-
2) A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	-	30	57,5
3) A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	-	0	0
- Absorbido con celulas seminales totales del donante:			
1) A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	0	10	-
2) A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	-	0	0
3) A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	-	0	0
- Absorbido con linfocitos del donante:			
1) A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	0	0	-
2) A1, A2/B17, Bw51/Cw6/Bw4	-	0	0
3) A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	-	0	0

TABLA 14.- Se muestran las actividades restantes en el suero anti-HLA-A2, A29 (MADRYC 20B) (1/10) después de la absorción con los espermatozoides purificados, las células seminales totales, y los linfocitos de tres individuos HLA-A2 positivos. La absorciones se realizaron en las proporciones siguientes:

- Espermatozoides puros: (v/v) 10×10^6 espermatozoides/ μ l de suero.
- Células seminales totales: (v/v)
- Linfocitos: 8×10^4 linfocitos/ μ l de suero.

Las actividades restantes se expresan como % de linfocitos muertos en el ensayo.

ABSORCION DE UN SUERO ANTI-HLA-B CON DISTINTAS PREPARACIONES
DE CELULAS SEMINALES Y LINFOCITOS

	FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL	
	A1,A2/Bw51,B17/Cw6/Bw4	A2,A3/B7,B40/Cw3/Bw6
SUERO ANTI-HLA-Bw51,w52,w35 (MADRYC 9B)(1/10) :		
- Sin Absorber	100	73,7
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:		
1) A1,A2/Bw51,B17/Cw6/Bw4	34,9	-
2) A2,A3/B7,B40/Cw3/Bw6	84,8	74,6
- Absorbido con células seminales totales del donante:		
1) A1,A2/Bw51,B17/Cw6/Bw4	10	-
2) A2,A3/B7,B40/Cw3/Bw6	80	65,7
- Absorbido con linfocitos del donante:		
1) A1,A2/Bw51,B17/Cw6/Bw4	10	-
2) A2,A3/B7,B40/Cw3/Bw6	80	67,5

TABLA 15.- Se muestran las actividades restantes en el suero anti-HLA-Bw51,w52,w35 (MADRYC 9B) (1/10) después de la absorción con los espermatozoides purificados, las células seminales totales y los linfocitos de un individuo HLA-B5 positivo y otro negativo para las especificidades detectadas por el suero MADRYC 9B. Las condiciones de la absorción se señalan en el pie de la Tabla 14. Las actividades restantes se expresan como % de linfocitos muertos en el ensayo.

ABSORCION DE UN SUERO ANTI-HLA-C CON DISTINTAS PREPARACIONES
DE CELULAS SEMINALES Y ESPERMATOZOIDES

	FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL		
	A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	A3, Aw23/Bw35, B40/Cw4/Bw6	A3, Aw24/B14, Bw35/Cw4/Bw6
SUERO ANTI-HLA-Cw4 (Bw05xD ₀₃ ⁰²) (1/10) :			
- Sin Absorber	76	85	80
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:			
1) A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	77,6	85,8	80
2) A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	62,2	75,5	64,8
- Absorbido con células seminales totales del donante:			
1) A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	40	65,4	50
2) A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	0	0	0
- Absorbido con linfocitos del donante:			
1) A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	44,3	67,4	64,8
2) A2, Aw32/B14, Bw35/Cw4/Bw6	0	0	0

TABLA 16.- Se muestran las actividades restantes en el suero anti-HLA-Cw4 (Bw05 xD₀₃⁰²) (1/10) después de la absorción con los espermatozoides purificados, las células seminales totales y los linfocitos de un individuo Cw4 positivo y otro Cw6 positivo. Las condiciones de la absorción se señalan en el pie de la Tabla 14. Las actividades restantes se expresan como % de linfocitos muertos en el ensayo.

ABSORCION DE UN SUERO ANTI-HLA-Bw6 CON DISTINTAS PREPARACIONES
DE CELULAS SEMINALES Y LINFOCITOS

	FENOTIPO HLA LINFOCITOS PANEL		
	A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	Aw23, A3/Bw35, B40/Cw3/Bw6	A2, Aw32/Bw35, B14/Cw4, Bw5
SUERO ANTI-HLA-Bw6 (HINCHCLIFFE)(1/15) :			
- Sin Absorber	100	90	90
- Absorbido con espermatozoides puros del donante:			
1) A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	100 95	80	80
2) A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	95	-	-
- Absorbido con células seminales totales del donante:			
1) A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	20 33,3	10	15
2) A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	95	-	-
- Absorbido con linfocitos del donante:			
1) A2, A3/B7, B40/Cw3/Bw6	0 0	0	0
2) A1, A2/Bw51, B17/Cw6/Bw4	60	-	-

TABLA 17.- Se muestran las actividades restantes en el suero anti-HLA-Bw6 después de la absorción con los espermatozoides purificados, las células seminales totales y los linfocitos de un individuo Bw6 positivo y otro Bw6 negativo. Las condiciones de la absorción se señalan en el pie de la Tabla 14. Las actividades restantes se expresan como % de linfocitos muertos en el ensayo.

EXPRESION DE LOS ESPERMATOZOIDES DE PRODUCTOS CODI-
FICADOS POR GENES DEL SISTEMA HLA DIFERENTES DE LOS
ANTIGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD; FACTOR B DE LA VIA
ALTERNATIVA DEL COMPLEMENTO.

EXPRESION EN LOS ESPERMATOZOIDES DE PRODUCTOS CODIFICADOS POR
GENES DEL SISTEMA HLA DIFERENTES DE LOS ANTIGENOS DE HISTOCOMPA-
TIBILIDAD; FACTOR B DE LA VIA ALTERNATIVA DEL COMPLEMENTO.

No hemos detectado la presencia del Factor B de la vía alternativa del complemento en plasma seminal o semen completo mediante técnicas de electroforesis seguida de inmunofijación (Alper et al., 1969) o doble inmunodifusión radial (1) (Ouchterlony) utilizando un antisuero específico anti-Factor B. Sin embargo, mediante doble inmunodifusión radial, utilizando este antisuero, se podía detectar la presencia de Factor B en diluciones de un "pool" de sueros humanos normales de hasta 1/40.

El antisuero anti-Factor B no es citotóxico frente a linfocitos totales, linfocitos B o espermatozoides. (Resultados no publicados).

No se ha detectado actividad de Factor B en el plasma seminal de seis individuos diferentes mediante ensayo hemolítico de esta actividad.

Coincidiendo con los resultados de Halbwachs y Lachmann, 1976, mediante ensayo hemolítico hemos encontrado esta actividad de Factor B en los linfocitos de individuos con leucemia linfóide crónica, (LLC), (linfocitos B).

Esta actividad que se eliminaba al preincubar los linfocitos de los individuos con leucemia linfóide crónica con el antisuero anti-Factor B estaba, por otro lado, ausente en los espermatozoides de seis individuos diferentes. Figura 5.

En resumen, tanto plasma seminal como células seminales no tienen actividad apreciable de Factor B.

(1) Después de la difusión los geles se lavaron exhaustivamente con PBS, con objeto de eliminar otras proteínas no precipitadas. Después de los lavados los geles se dejaron secar y se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue.

AUSENCIA DE FACTOR B EN LOS ESPERMATOZOIDES

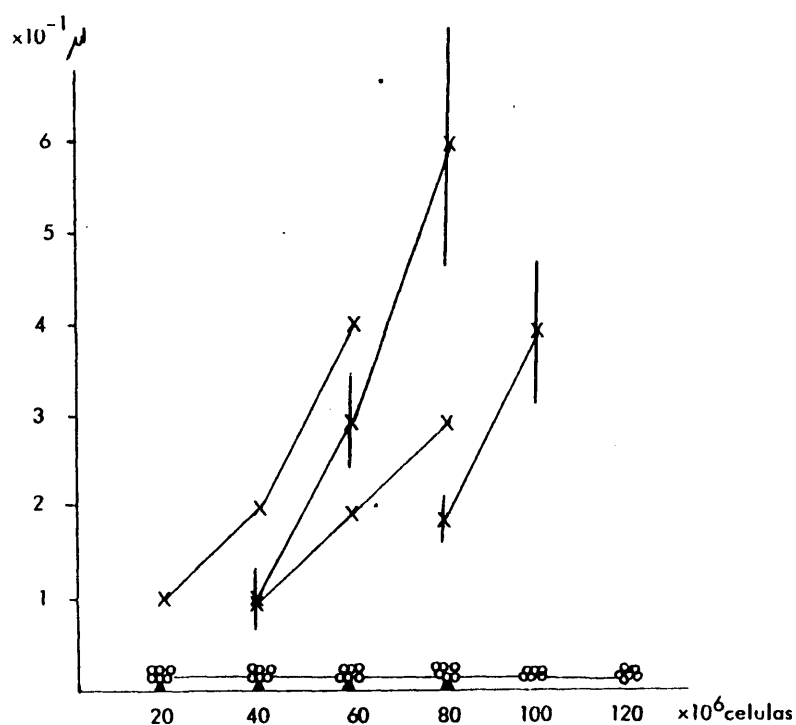


FIGURA 5.- Actividades de Factor B equivalentes a la actividad (μl) de un "pool" de sueros humanos encontradas en distintas cantidades de las siguientes células:

- X - Linfocitos de cuatro individuos con leucemia linfóide crónica.
- O - Espermatozoides de seis individuos diferentes,

correspondientes a cuatro experimentos representativos. En cada experimento se preparó una curva patrón con cantidades crecientes de un "pool" de sueros humanos frescos normales, a la que se refirieron las actividades del Factor B encontradas en los linfocitos o los espermatozoides. En un experimento (\blacktriangle) se preincubaron los linfocitos de un individuo con leucemia linfóide crónica con anti-Factor B. Las barras indican las desviaciones estándar para triplicados en los puntos que se indican.

TIPAJE HLA-D:

CORRELACION DE ANTIGENOS HLA-D Y HLA-DR

EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION ESPAÑOLA.

1.- TIPAJE HLA-D: CORRELACION DE ANTIGENOS HLA-D Y HLA-DR EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION ESPAÑOLA.

En la Tabla 18 se muestran los fenotipos HLA completos de los 61 individuos utilizados en los experimentos de tipaje del locus HLA-D. Se incluye también el fenotipo HLA-D objeto de esta parte del estudio. Dentro de estos 61 individuos se marcan con + los 13 individuos que constituyeron el panel de donantes de espermatozoides.

Las frecuencias génicas (p) de los alelos del locus HLA-D se muestran en la Tabla 19. Los alelos más frecuentes son Dw3, Dw5 y Dw7 (1). No se pudo definir ningún alelo HLA-D en 14 de los individuos (22,93%) siendo la frecuencia génica total para estos blancos del 41,32%.

Nuestra muestra de la población española se encuentra en equilibrio Hardy-Weimberg (Hardy, 1908; Weimberg, 1908) para las frecuencias génicas señaladas anteriormente, y según se detalla en la Tabla 20 no existen diferencias significativas entre los valores encontrados y los esperados para cada uno de los fenotipos HLA-D posibles.

Comparando las frecuencias génicas encontradas en nuestra población con otras poblaciones caucásicas, Tabla 21, hay que señalar que Dw5 está significativamente aumentado en nuestra población, mientras que Dw6 está significativamente disminuido. Dw3 y Dw7 están aumentados en nuestra población, aunque este aumento no es significativo.

Dw5 está en desequilibrio de ligamiento con B40 en nuestra población (2), Tabla 22, mientras que este antígeno B40 está asociado a Dw6 en otras poblaciones caucásicas estudiadas. Terasaki et al. 1980.

(1) Los antígenos HLA-DR7 y HLA-DR5 son los alelos HLA-DR más frecuentes en la población española. (Arnaiz Villena et al., 1981a).

(2) En nuestra población HLA-DR5 y HLA-B40 están también en desequilibrio de ligamiento (Arnaiz Villena et al., 1981a).

Los desequilibrios de ligamiento entre Dw3 y B18; Dw1 y Bw35; y Dw4 y B15 no aparecen en nuestra población. En otros estudios sobre la población española no se han encontrado las asociaciones DR3-B18, DR1-Bw35 y DR4-B15, características de otras poblaciones caucasoides (Arnaiz Villena, et al., 1981a).

Los desequilibrios de ligamiento entre Dw2 y B7; Dw7 y Bw44; y Dw7 y B13 son comunes a otras poblaciones caucasoides. Terasaki et al., 1980.

En la Tabla 23 se muestra la correlación HLA-D/HLA-DR en nuestra muestra de la población española. Dw3, Dw4 y Dw6 no correlacionan con sus respectivos HLA-DR (DR3, DR4 y DRw6) y Dw1 muestra una correlación de 0,46 con DR1. Dw2, Dw5 y Dw7 correlacionan bien (0,72, 0,67 y 0,69) con sus respectivos HLA-DR. (Véase discusión, pág. 189).

FENOTIPOS HLA

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	Bw4, Bw6	HLA-DR	HLA-D	DC
1 - A.A.	1,29	17,w44	w6	Bw4	5,7	5	S,S
2 - J.O.	w24,11	7,w60	w3	Bw6	1,2	2	S,S
3 - M.C.	1,2	w51,37	w6	Bw4	1	1	S,S
4 - F.S.	w30,2	w60,18	w3,w5	Bw6	2,4	3,5	F,S
5 - F.T.	w32,2	w35,14	w4	Bw6	5,7	3,5	S,S
6 - V.N.	2,11	w35,27	w1,w4	Bw4, Bw6	1	1	S,S
7 - I.R.	w33,29	w44		Bw4	7	7	-
8 - P.C.	1,2	w44,w62	w3	Bw4, Bw6	4,7	4,7	F,S
9 - A.B.	w24,2	w52,w44	w5	Bw4	6,9	X	F,S
10 - A.C.A.	w26,2	w52,w59		Bw4, Bw6	6,6	6	F,S
11 - R.D.	w26,3	16,14.1		Bw4, Bw6	4,5	3	F,S
12 - B.A.	w33,11	w35,14.1	w4	Bw6	3,6	X	-
13 - R.B.	1,2	17,w44	w5	Bw4	4,7	7	S,S
14 - J.D.	3,11	w51,40	w1,w3	Bw4, Bw6	4	6	F,F
15 - P.H.	2	7		Bw6	2	2	S,S
16 - C.Q.	w26,1	w62,13	w3,w6	Bw4, Bw6	7,8	1,7	S,S
17 - J.B.	w24,2	w44,18	w5	Bw4, Bw6	1,5	1,5	S,S
18 - E.R.	1,29	w44,37		Bw4	7	6,7	F,F
19 - L.E.	w24,1	w45,w35	w4	Bw6	4,7	7	F,S1
20 - J.M.	w23,2	w44,w61	w4,w5	Bw4, Bw6	5	5	S,S
21 - J.C.	w32,2	w51,w55	w3	Bw4, Bw6	2,7	7	S,S
22 - N.V.	w30,29	w44,w50	w5	Bw4, Bw6	5,7	5	F,S
23 - J.P.	1,3	w41,8		Bw6	7,5	X	F,S
24 - R.A.	w24,3	w35,14	w4	Bw6	5,6	3,5	S,S1
25 - D.P.	2,29	w49,w44		Bw4	5,7	7	F,S
26 - P.G.	w33,w30	w22,14.1		Bw6	3,7	X	F,F1
27 - J.H.	w32,9	17,w51		Bw4	X	X	F,S
28 - F.D.	3,29	w44,27		Bw4	2,7	7	F,S
29 - J.R.	w23,11	w44	w4	Bw4	7,4	3,7	F,F
30 - S.R.	1,2	w51,17	w6	Bw4	7	7	F,S
31 - R.G.	w26,3	16,14.1		Bw4, Bw6	4,5	3,5	S,S
32 - M.G.	w33,28	w63,w60	w3	Bw4, Bw6	5,5	5	S,S
33 - I.C.	w23,3	w35,40	w4	Bw6	-	X	F,S
34 - A.S.	2,3	7,w60	w3	Bw6	2,7	2,3	S,S
35 - J.A.	w25,9	w61,18	w1	Bw4, Bw6	2,5	2,5	F,S
36 - J.S.	1,2	15,w49	w3	Bw4, Bw6	5	X	S,S
37 - C.L.	w25,2	w52,7		Bw4, Bw6	2,9	2,3	S,S
38 - A.C.	2,11	7,27	w1	Bw4, Bw6	1	1,2	S,S
39 - M.V.	2,28	w22,w45	w1	Bw6	1,5	5	F,F
40 - A.F.	w24,1	w61,27	w2	Bw4, Bw6	2,5	2,5	S,S
41 - B.G.	w30,2	w44,40	w3,w5	Bw4, Bw6	X	X	S,S

	HLA-A	HLA-B	HLA-C	Dw4, Dw6	HLA-DR	HLA-D	Bf
42 - D.I.	w30,2	7,13		Dw4, Dw6	7	7	S,S
43 - F.S.	11,29	w44,w35	w4	Dw6	7	X	F,F
44 - A.F.D.	2,11	w44,w35	w4,w5	Bw4, Bw6	3	1,3	S,S
45 - V.C.	w32,29	w35	w4	Bw6	1,6	1	S,S
46 - L.G.	2	w22	w1	Dw4, Bw6	3,5	3	F,F
47 - L.G.R.	1,2	17,w53	w4	Dw4	7	7	F,S
48 - L.T.	w30,11	13	w6	Dw4	7	7,4	S,S
49 - C.M.	3	7		Bw6	7	X	S,S
50 - F.H.	w26,1	8,w51		Dw4, Bw6	3,9	3	S,S
51 - R.E.	w30,2	w51,w52	w2	Bw4	1	3,5	F,S
52 - D.H.	w32,3	w63,40	w2,w3	Bw6	3,5	3,5	F,F
53 - H.B.	w30,2	8,18	w5	Dw6	1,3	X	S,F1
54 - F.H.	2,3	14,17	w3	Bw4, Bw6	1	X	S,S
55 - C.C.	2,3	w51,7	w2	Bw4, Dw6	2,9	2	S,F1
56 - M.P.	w30,2	w44,w41	w2,w5	Bw4, Bw6	5,7	4,7	F,S
57 - S.S.	w23,1	w35,14	w4	Bw6	1,3	X	S,S
58 - I.S.	w30,3	14,18	w5	Bw6	2,3	1,2	F,F1
59 - I.M.	w25,1	w62,8	w3	Bw6	X	4	S,S
60 - V.H.	w25,2	w44,w39		Bw4, Bw6	1,2	7	F,S
61 - I.D. ⁺	w30,3	w51,18	w1,w5	Bw4, Bw6	3	X	F,F1

TABLA 18.- Los alelos del Factor B (Bf) se determinaron mediante una técnica de electroforesis seguida de inmunofijación utilizando un antisuero anti-Factor B (Alper et al., 1969), tal como se describió en Rodríguez de Córdoba et al. (1981).

(X) Representa antígenos no detectados por nosotros o no definidos todavía

(-) No estudiado

Los individuos marcados con + constituyen el panel de donantes de espermatozoides.

FRECUENCIAS GENICAS DE LOS ANTIGENOS HLA-D
EN LA POBLACION ESPAÑOLA (n= 61)

	n	p
Dw1	8	0,0678
Dw2	9	0,0767
Dw3	13	0,1130
Dw4	4	0,0333
Dw5	14	0,1222
Dw6	3	0,0250
Dw7	16	0,1411
DwX	40	0,4132

TABLA 19.- Donde n representa el numero de individuos que presentan el antígeno y p la frecuencia genica ; calculada segun

$p = (1 - \sqrt{1 - f})$, siendo f la frecuencia fenotípica para cada antígeno.

142

**EQUILIBRIO HARDY-WEIMBERG PARA LOS ALELOS DEL
LOCUS HLA-D EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION
ESPAÑOLA (n = 61)**

	OBSERVADOS		ESPERADOS	
	n	%	n	%
Dw1, Dw1	3	4,91	3,69	6,06
Dw1, DwX	2	3,27	0,63	1,04
Dw1, Dw2	1	1,63	0,93	1,53
Dw1, Dw3	0	0	0,27	0,44
Dw1, Dw4	1	1,63	1,01	1,65
Dw1, Dw5	0	0	0,21	0,34
Dw1, Dw6	1	1,63	1,16	1,91
Dw1, Dw7	3	4,91	4,22	6,92
Dw2, Dw2	2	3,27	1,05	1,73
Dw2, DwX	0	0	0,31	0,51
Dw2, Dw3	2	3,27	1,14	1,87
Dw2, Dw4	0	0	0,23	0,38
Dw2, Dw5	0	0	1,33	2,19
Dw2, Dw6	3	4,91	6,47	10,61
Dw2, Dw7	0	0	0,46	0,75
Dw3, Dw3	6	9,83	1,68	2,76
Dw3, DwX	0	0	0,34	0,56
Dw3, Dw4	1	1,63	1,94	3,18
Dw3, Dw5	1	1,63	1,75	2,86
Dw3, Dw6	0	0	0,50	0,81
Dw3, Dw7	0	0	1,01	1,65
Dw4, Dw4	3	4,91	0,57	0,94
Dw4, DwX	5	8,19	7,07	11,60
Dw4, Dw5	0	0	0,37	0,61
Dw4, Dw6	0	0	2,10	3,44
Dw4, Dw7	2	3,27	1,30	2,12
Dw5, Dw5	1	1,63	0,43	0,70
Dw5, DwX	10	16,39	8,32	13,65
Dw5, Dw6	14	22,95	10,41	17,07

TABLA 20

COMPARACION DE LAS FRECUENCIAS GENICAS DE LOS ANTIGENOS
HLA-D ENCONTRADAS EN LA POBLACION ESPAÑOLA CON LAS OB-
TENIDAS PARA OTRAS POBLACIONES.

	Dw1	Dw2	Dw3	Dw4	Dw5	Dw6	Dw7	DwX
CAUCASOIDES USA ^a	0,048	0,117	0,090	0,052	0,061	0,089	0,098	0,425
CAUCASOIDES (8ª Workshop) ^b	0,069	0,075	0,082	0,053	0,056	0,100	0,103	0,459
ESPAÑOLES ^c	0,068	0,075	0,113	0,033	0,122 [*]	0,025 [*]	0,141	0,413

^{*} $p < 0,05$

TABLA 21 .- Frecuencias genicas tomadas de : a) Bodmer et al., 1978 , (7ª Workshop); b) Terasaki et al., 1980 , (8ª Workshop); c) Presente estudio.

DESEQUILIBRIOS DE LIGAMIENTO (Δ) DE LOS ANTIGENOS DEL
LOCUS HLA-D CON ANTIGENOS CODIFICADOS POR OTROS LOCI
DEL SISTEMA HLA EN LA POBLACION ESPAÑOLA

	$\Delta(\times 1000)$	χ^2	P
B7 - Dw2	36,66	15,42	< 0,0005
Bw44 - Dw7	49,36	6,88	< 0,01
B13 - Dw7	21,39	5,32	< 0,05
B40 - Dw5	35,07	5,55	< 0,05
Bw4 - Dw7	66,3	5,39	< 0,05

TABLA 22 - Los desequilibrios de ligamiento (asociaciones gaméticas) entre los antígenos HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6,-DR o los alelos del Factor B y los antígenos HLA-D se determinaron según Mattiuz et al., 1970.

CORRELACION ENTRE LOS ANTIGENOS HLA-D y HLA-DR
EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION ESPAÑOLA (n=61)

	D/DR				χ^2	r
	+/+	+/-	-/+	-/-		
Dw1/DR1	5	3	7	46	10,69	0,42
Dw2/DR2	8	1	4	48	32,01	0,72
Dw3/DR3	4	9	6	42	2,49	0,20 •
Dw4/DR4	1	3	9	48	0,075	0,04 •
Dw5/DR5	12	2	6	41	27,60	0,67
Dw6/DRw6	1	2	4	54	2,65	0,21 •
Dw7/DR7	15	1	8	37	29,0	0,69
DwX/DRwX	18	23	5	15	2,04	0,18 •

• $p > 0,05$

TABLA 23 .- Los coeficientes de correlacion ,r, se calcularon segun:

$r = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}}$, siendo n el numero de individuos examinados y χ^2 el valor de CHI cuadrado en la tabla de contingencia 2x2 entre el fenotipo HLA-D y HLA-DR, para cada pareja de antigenos indicada .

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS:

AUSENCIA DE PRODUCTOS HLA-D EN ESPERMATOZOIDES

1.- CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS.

En las Figuras 6a, 7a y 8a se muestran los resultados de los cultivos mixtos espermatozoides-linfocitos correspondientes a 14 individuos respondedores estimulados con los espermatozoides de cuatro individuos diferentes en la relación espermatozoides/linfocitos 1/1. Simultáneamente, los linfocitos respondedores se estimularon con los linfocitos tratados con mitomicina C del donante de los espermatozoides utilizados. Figuras 6b, 7b y 8b.

Como puede observarse los linfocitos de los individuos respondedores son estimulados por los linfocitos (Mit.C) de los donantes de los espermatozoides y ya a cuatro días de cultivo las cpm correspondientes a los cultivos mixtos linfocitos-linfocitos (Mit.C) son considerablemente elevadas respecto a las de los cultivos mixtos autólogos linfocitos-linfocitos.

Cuando estos mismos linfocitos se estimularon con los espermatozoides del mismo individuo cuyos linfocitos (Mit.C) se habían utilizado anteriormente, las respuestas fueron significativamente inferiores (1) y solo en algunas ocasiones estas respuestas superaban el doble del valor de los cultivos mixtos autólogos linfocitos-linfocitos. Esto ocurrió a 4, 5 y 6 días de cultivo.

Estas pequeñas estimulaciones (más de 2 veces el cultivo mixto autólogo linfocitos-linfocitos) encontrado en algunas combinaciones no está relacionado con el sexo de la célula respondedora. Figura 9.

Los resultados obtenidos anteriormente en el cultivo mixto espermatozoides-linfocitos para la relación 1/1 se confirmaron sobre un panel diferente de individuos respondedores (hombres y mujeres), Figura 10, con la diferencia de que en esta ocasión un individuo (varón) respondía claramente a los espermatozoides

(1) A seis días de cultivo se podían observar espermatozoides móviles en el medio. No parece, por tanto, que nuestras condiciones afecten la viabilidad de los espermatozoides en cultivo.

de otro individuo no relacionado. En el resto de las combinaciones las estimulaciones encontradas no difieren significativamente de las que presentaban los cultivos mixtos espermatozoides-linfocitos autólogos y, en cualquier caso, solo en algunas ocasiones superaron en dos veces el cultivo mixto autólogo linfocitos-linfocitos.

Utilizando los mismos linfocitos respondedores y los mismos espermatozoides se ensayaron distintas proporciones espermatozoides/linfocitos. En las Figuras 11 y 12 se muestran estos resultados. Para la relación 5/1 las estimulaciones en los cultivos mixtos espermatozoides-linfocitos son ligeramente superiores que las obtenidas para la relación 1/1. Sin embargo, este aumento afecta también a los cultivos mixtos espermatozoides-linfocitos autólogos. Para esta relación (5/1) al menos 2 respuestas son claramente positivas. Los linfocitos respondedores, en este caso, pertenecían a un hombre unos y los otros a una mujer.

En la Figura 13 se muestra la estimulación sobre los mismos linfocitos respondedores de las Figuras 10, 11 y 12 cuando en lugar de espermatozoides se utilizaron los linfocitos (Mit.C) de ese mismo individuo.

En resumen, las estimulaciones de linfocitos en cultivo con espermatozoides son muy pequeñas, excepto en algunos pocos casos; ninguna de estas estimulaciones va ligada al sexo. (Véase discusión pág. 186).

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS

4° DIA (Relacion E/L 1:1)

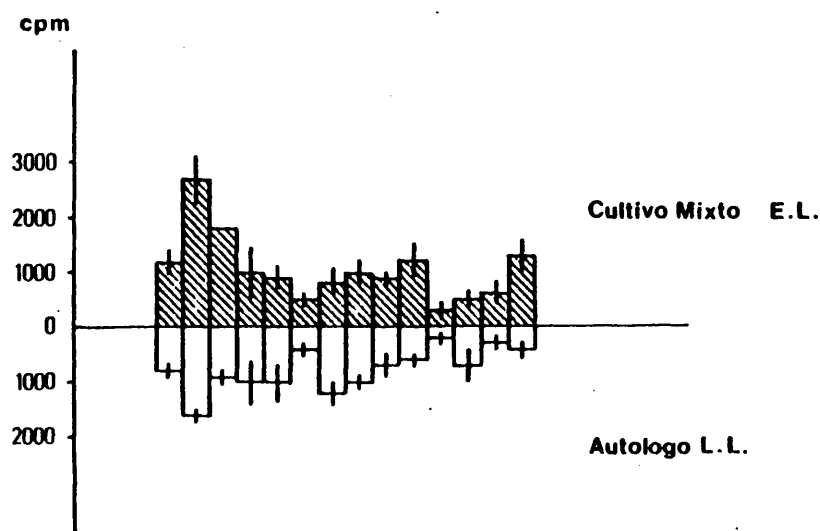


FIGURA 6a .- Se representan $\text{cpm} \pm$ desviación standard. Cada barra corresponde a los linfocitos de un individuo diferente estimulado con espermatozoides, Cultivo Mixto E/L, parte rayada, y sin estimular, Autologo L/L, parte vacía. El tiempo de cultivo y la relación espermatozoides/linfocitos, E/L, se indican en el encabezamiento.

Autologo L.L.: Control negativo en el que se cultivan solos los linfocitos respondedores, el número de linfocitos en estos cultivos es el mismo que de linfocitos respondedores en los cultivos mixtos E.L., 50000 células/pocillo.

CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS

4° DIA

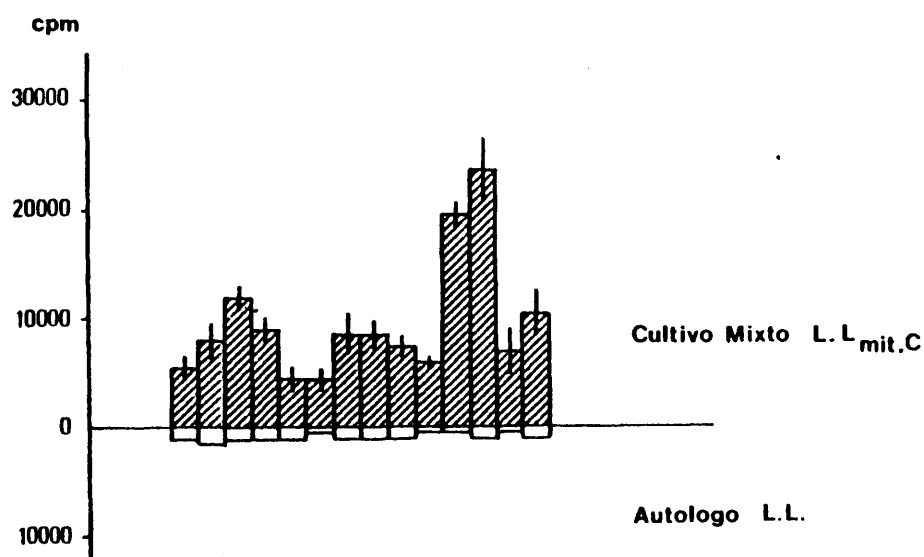
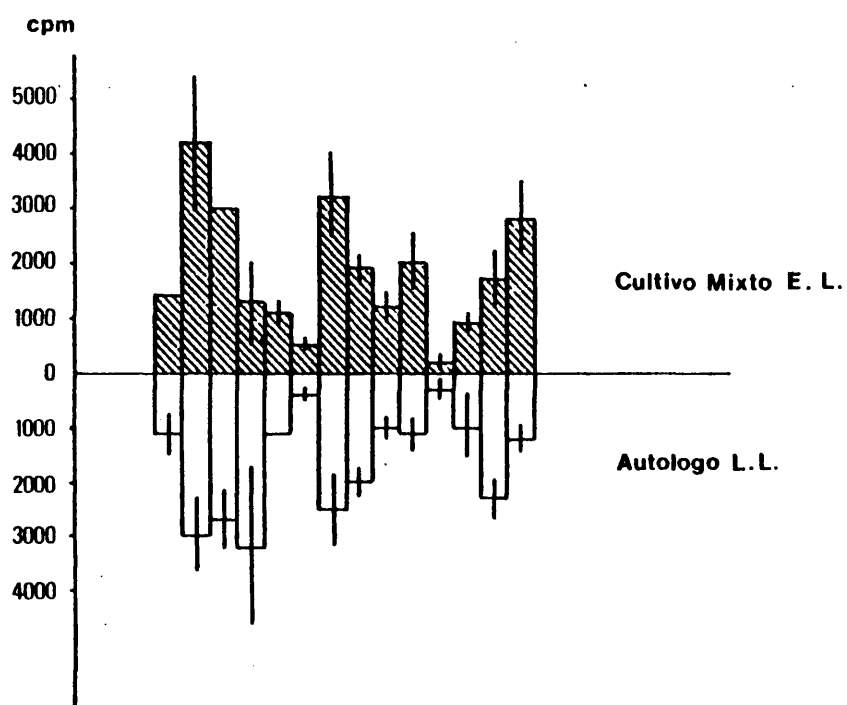


FIGURA 6b .- Se representan $\text{cpm} \pm$ desviación standard . Cada barra corresponde a los linfocitos de un individuo diferente estimulado con linfocitos (Mit.C), Cultivo Mixto $L/L_{\text{mit.C}}$, parte rayada, y sin estimular, Autologo L/L, parte vacía. Relación $L/L_{\text{mit.C}}$ 1/1 . El tiempo de cultivo se indica en el encabezamiento.

Autologo L.L.: Control negativo en el que se cultivan solos los linfocitos respondedores, el número de linfocitos en estos cultivos es el mismo que el de linfocitos respondedores en los cultivos mixtos $L.L_{\text{mit.C}}$, 50000 células / pocillo.

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS5º DIA (Relacion E/L 1:1)FIGURA 7a .- Igual que en la Figura 6a.

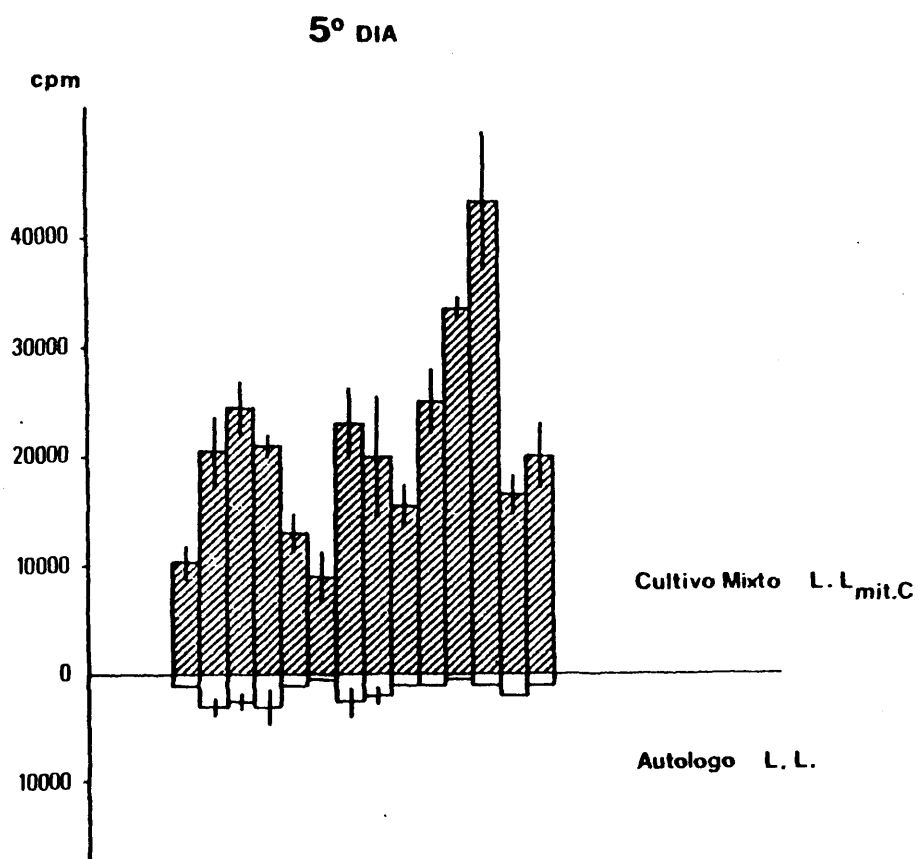
CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS

FIGURA 7b.- Igual que en la Figura 6b.

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS

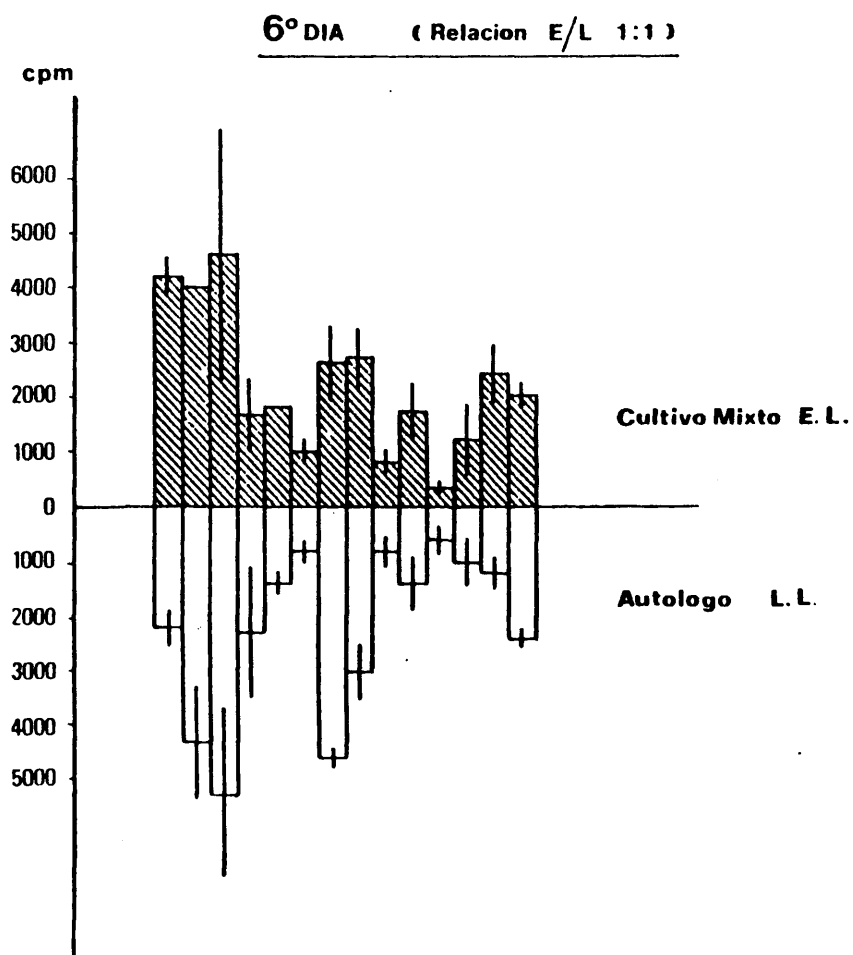


FIGURA 8a .- Igual que en la Figura 6a.

CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS

6° DIA

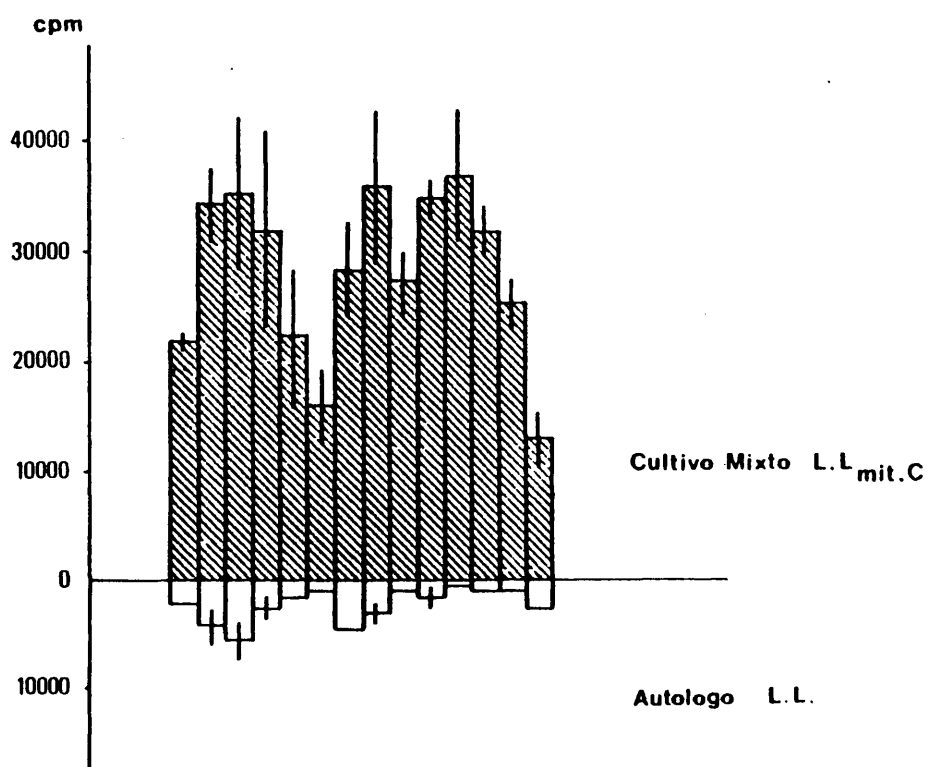


FIGURA 8b. - Igual que en la Figura 6b.

NO INFLUENCIA DEL SEXO DE LOS LINFOCITOS RESPONDEDORES
EN EL CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS

(Relacion E/L: 1/1)

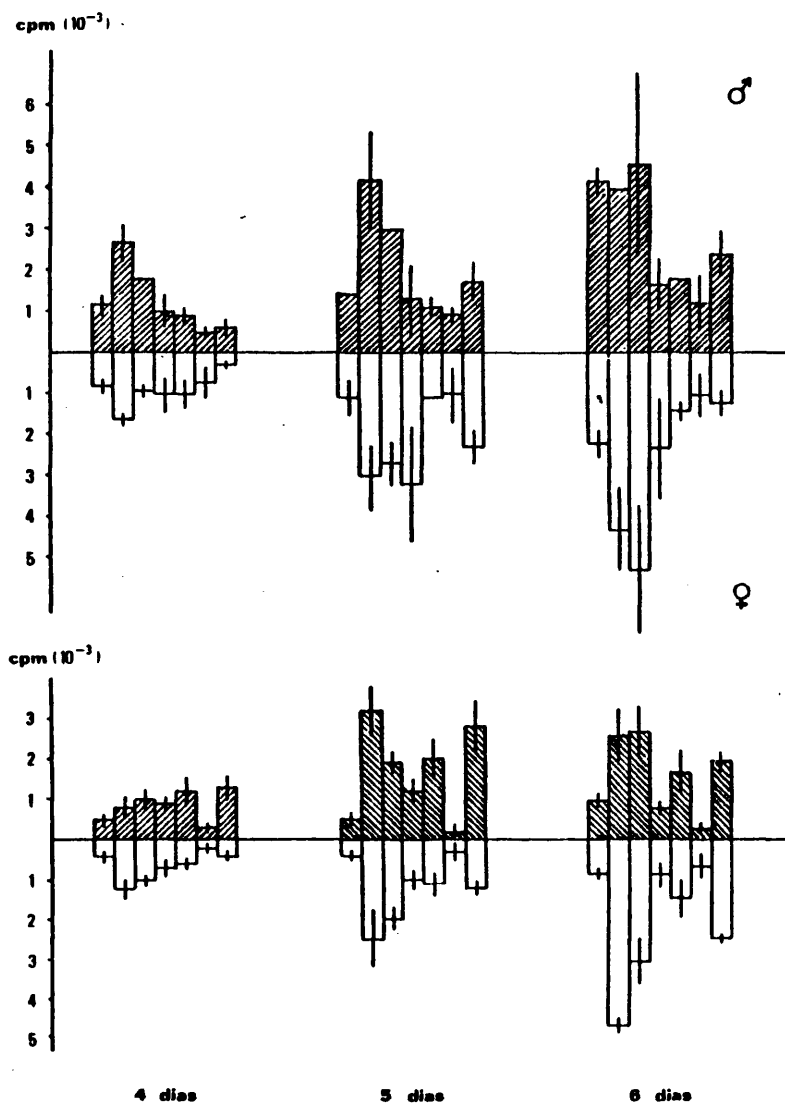


FIGURA 9.- Igual que en la Figura 6a. Arriba los linfocitos respondedores pertenecian a hombres. Abajo los linfocitos eran de mujeres.

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS

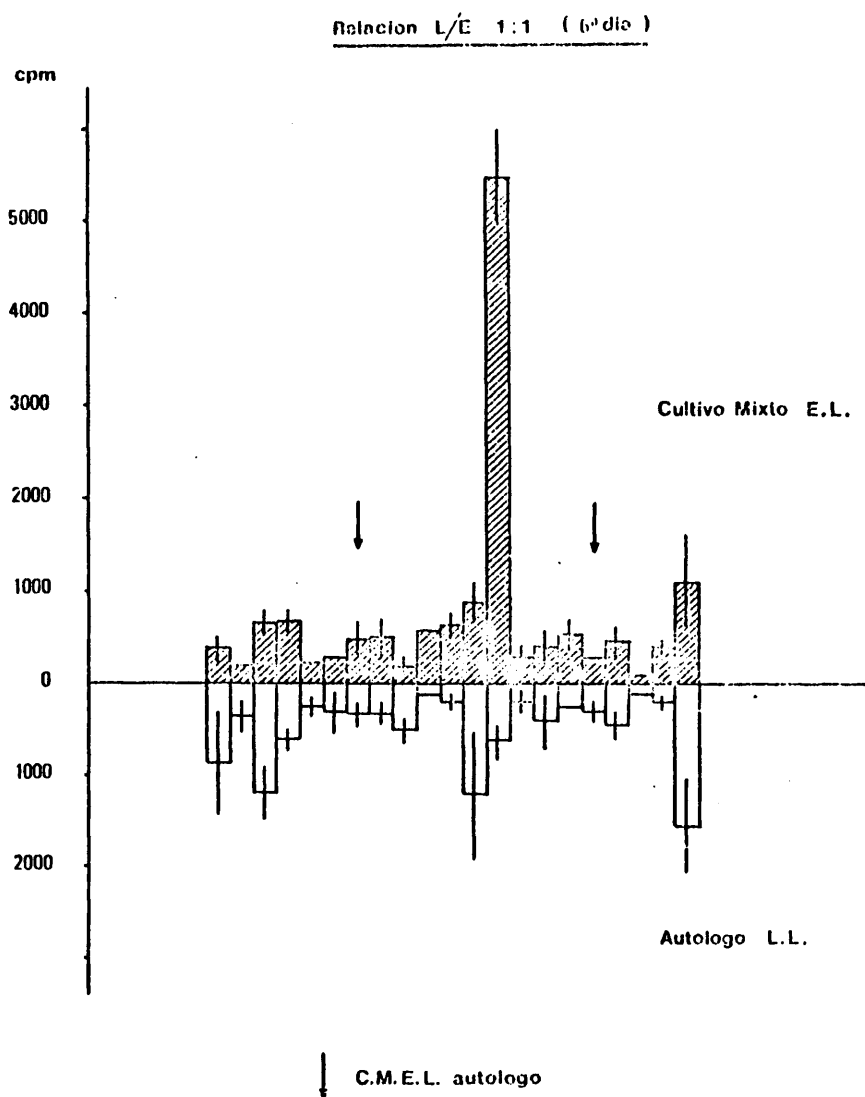


FIGURA 10.- Igual que en la Figura 6a.

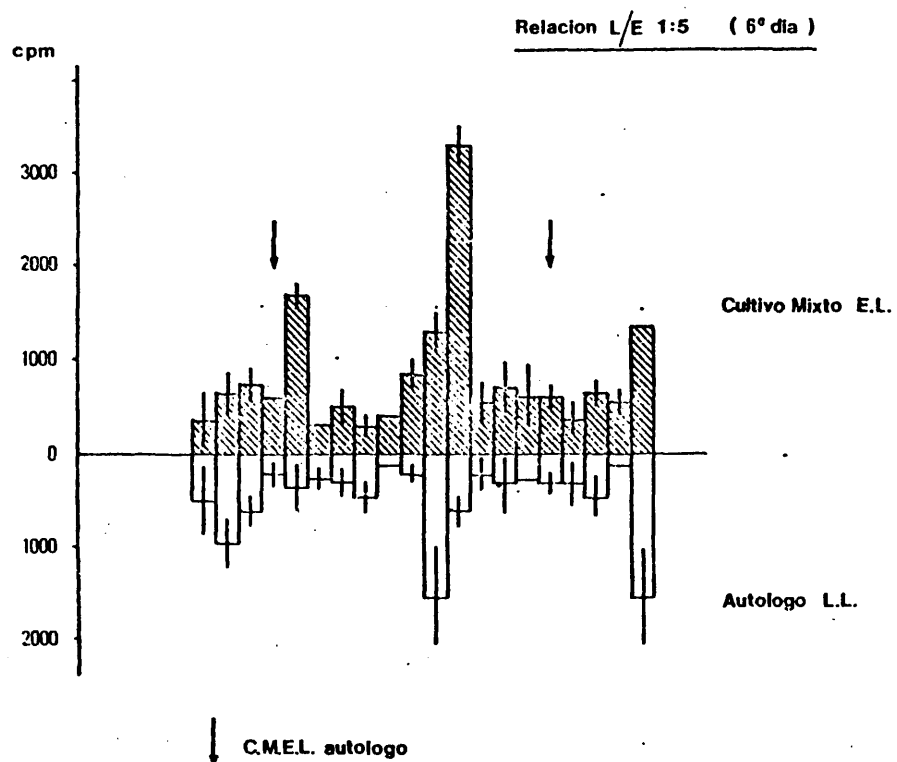
CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS

FIGURA 11.- Igual que en la Figura 6a.

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS

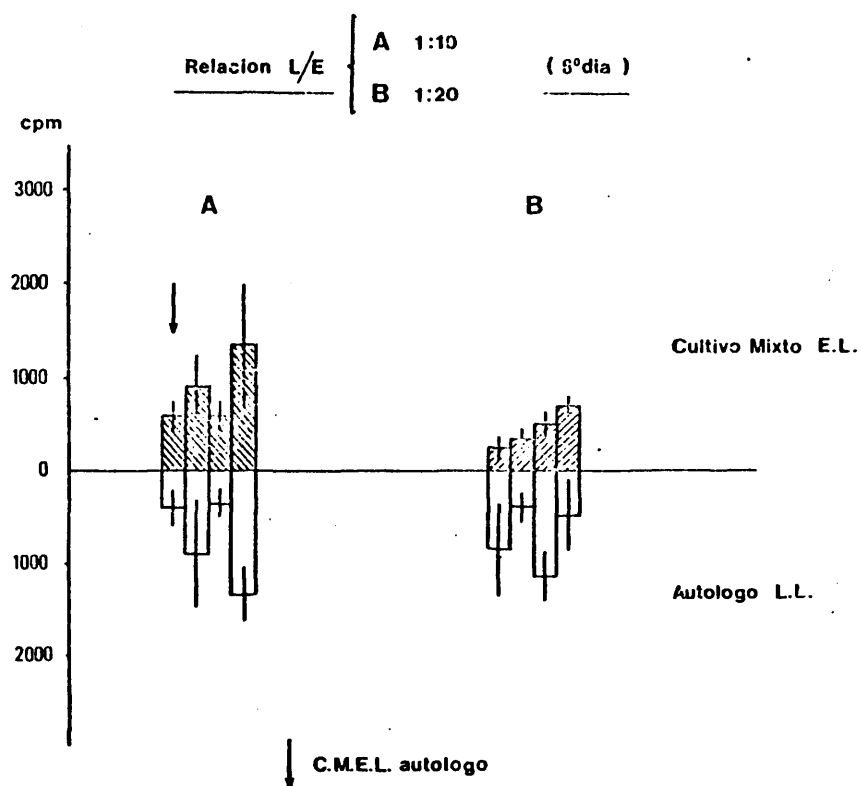


FIGURA 12.- Igual que en la Figura 6a.

CULTIVO MIXTO DE LINFOCITOS

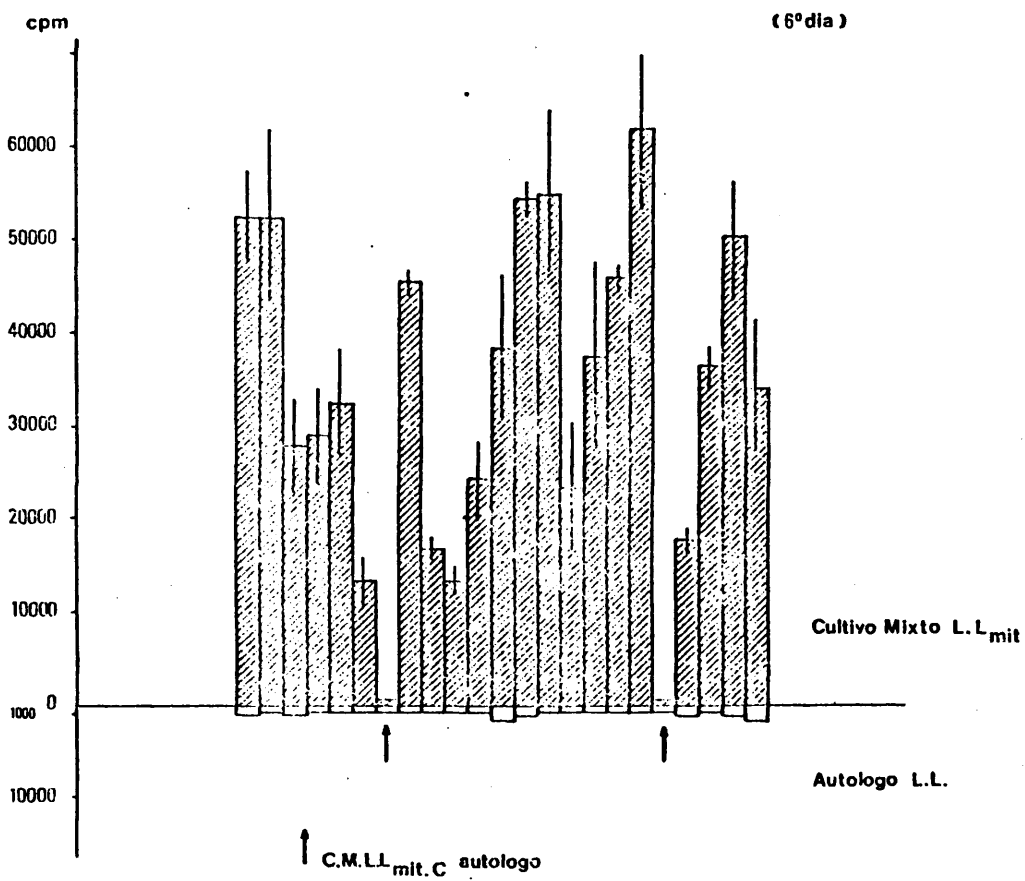


FIGURA 13.- Igual que en la Figura 6b.

2.- CULTIVO MIXTO LINFOCITOS-CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES.
(C.S. no E.)

Los linfocitos de los individuos utilizados en los experimentos que se representaban en las Figuras 10, 11, 12 y 13 se enfrentaron en cultivo mixto a las C.S. no E. obtenidas de las mismas muestras de semen que los espermatozoides que se utilizaron en aquellos experimentos.

La Figura 14 muestra los resultados de estos cultivos mixtos. Como puede observarse estas C.S. no E. estimulan claramente a los linfocitos, cuando se comparan las cpm obtenidas bien con las correspondientes al cultivo mixto autólogo linfocitos-linfocitos o con las cpm correspondientes al cultivo mixto autólogo linfocitos-C.S. no E.

Los linfocitos de uno de los individuos utilizados, sin embargo, no eran estimulados por las C.S. no E. de otro individuo no relacionado.

CULTIVO MIXTO (LINF.-CELULAS SEMINALES NO ESPERM.)

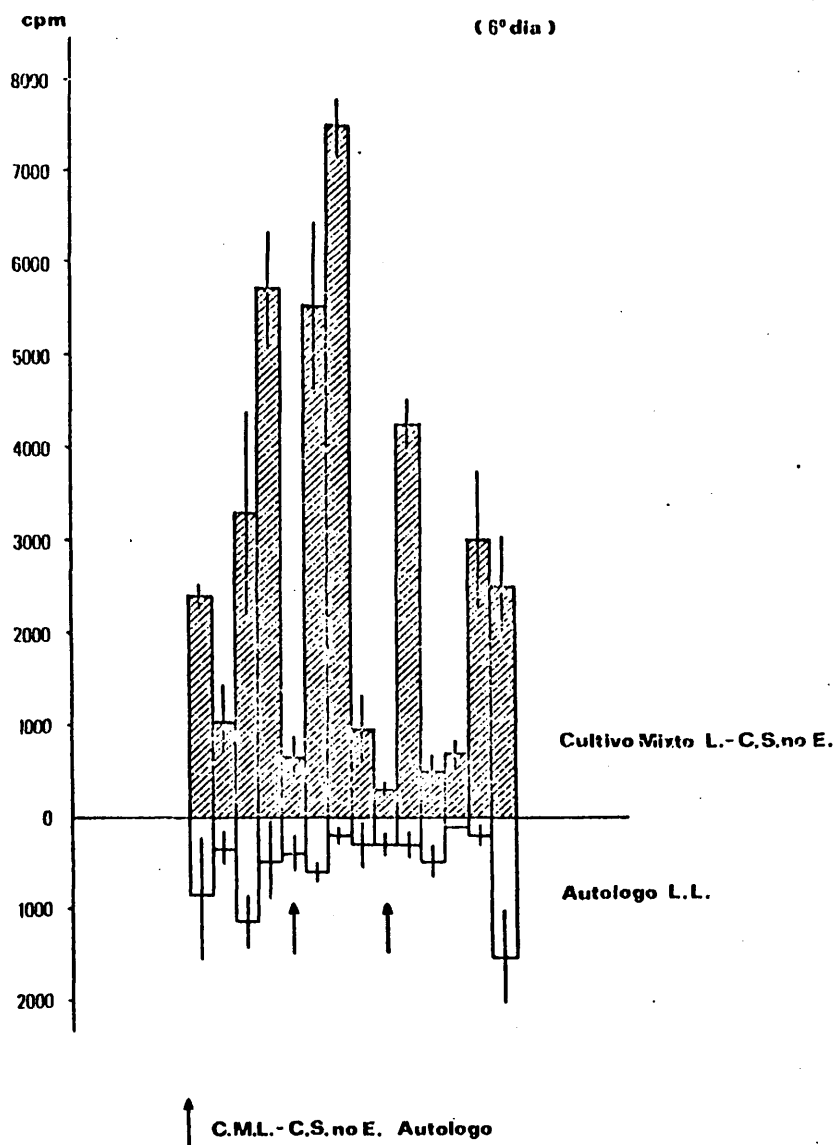


FIGURA 14.- Se representan $\text{cpm} \pm$ desviación standard. Cada barra corresponde a los linfocitos de un individuo diferente estimulados con C. S.no E., Cultivo Mixto L.-C.S.no E., parte rayada, y sin estimular, Autologo L.-L., parte vacía. Relación L/C.S.no E., 1/1.
Autologo L.L.: Control negativo en el que se cultivan solos los linfocitos respondedores, el número de linfocitos en estos cultivos es el mismo que el de linfocitos respondedores en los cultivos mixtos L.C.S.no E., 50000 células/pocillo.

3.- AUSENCIA EN ESPERMATOZOIDES DE PRODUCTOS HLA-D.

Con objeto de determinar si las estimulaciones encontradas en el cultivo mixto linfocitos-espermatozoides eran debidas al reconocimiento de aloantígenos codificados por el locus HLA-D, se realizaron estos experimentos utilizando individuos de fenotipo HLA-D conocido.

Los resultados se muestran en las Tablas 24a, 24b y 25 donde las estimulaciones, en cpm, se comparan con las obtenidas utilizando linfocitos (Mit. C) del mismo individuo como células estimulantes, y con los controles autólogos.

En las Tablas 26a, 26b y 27 se muestran las estimulaciones obtenidas en los cultivos mixtos linfocitos-espermatozoides como % de estimulaciones.

Para la relación espermatozoides/linfocitos (1/1) se realizaron 41 combinaciones, 7 de las cuales correspondían a cultivos mixtos autólogos linfocitos-espermatozoides. El 44% (15/34) de las combinaciones alogénicas presentaba un % de estimulación de 0 ó menor de 0 (cpm cultivo mixto E/L < cpm cultivo autólogo L/L). El 23,5% de estas combinaciones alogénicas (8/34) tenía un % de estimulación entre 0-75% ; en el 11,7% (4/34) estaban entre 75-100% y en el 20% restante (7/34) eran superiores a 100%. De las 7 combinaciones autólogas (cultivo mixto espermatozoides-linfocitos autólogo), 3 presentaban un % de estimulación de: 60,7; 62,8 y 68,1, respectivamente. En las 4 restantes eran de 0% o menor de 0%.

Para la relación espermatozoides/linfocitos (5/1); 23 combinaciones, 3 de las cuales correspondían a cultivos mixtos autólogos espermatozoides-linfocitos, se encontró que las 3 combinaciones autólogas presentaban estimulaciones entre 0-75% (60,7, 36,7 y 74,6, respectivamente). De las 20 combinaciones alogénicas, 8,(40%) eran de 0% o menor de 0% ; 2,(10%) estaban entre 0 y 75% y el resto, 10,(50%) eran superiores al 100%.

A la vista de estos resultados y suponiendo que la estimulaciones en el cultivo mixto espermatozoides-linfocitos se debieran a diferencias alogénicas

para antígenos del locus HLA-D, se hicieron las siguientes consideraciones:

- como los controles autólogos, lógicamente negativos si las estimulaciones se debieran a diferencias alagénicas del locus HLA-D, presentaban % de estimulación entre 0-75%, se consideró este intervalo como respuesta negativa para el cultivo mixto espermatozoides-linfocitos;
- como respuesta dudosa se consideró el intervalo de estimulaciones entre 75-100%, y
- se consideraron valores de respuesta positiva aquellas estimulaciones superiores a 100% (2 veces el control autólogo linfocitos-linfocitos).

De acuerdo con estos criterios se valoró la respuesta en cada combinación y se comparó con la que cabría esperar del fenotipo HLA-D de los individuos utilizados. Figuras 15 y 16.

Como puede observarse las estimulaciones encontradas en el cultivo mixto espermatozoides-linfocitos correlacionan mal con las que cabría esperar si estas estimulaciones se debieran al reconocimiento de aloantígenos HLA-D, tanto para la relación espermatozoides/linfocitos, 1/1, ($r = 0,233$); como para la relación espermatozoides/linfocitos, 5/1, ($r = 0,339$).

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS (CPM)

(RELACION E/L, 1/1)

ESPERMATOZOIDES ESTIMULADOR :

LINFOCITOS RESPONDEDOR:

	A.S. Dw2, Dw3	S.R. Dw7, DwX	J.A. Dw2, Dw5
R.B. Dw7, DwX	-	4705±411 11162±746 3490±1288	-
A.S. Dw2, Dw3	382±191 614±104	-	-
J.A. Dw2, Dw5	-	332±83 45424±1024 513±71	332±83 - 287±12
V.N. Dw1, DwX	857±692 54559±1396 325±131	185±88 32344±6093 241±19	185±88 37493±10496 249±123
C.Q. Dw1, Dw7	343±170 59512±9217 184±25	306±241 13528±316 293±10	306±241 46228±11147 414±141
A.A. Dw5, DwX	1203±280 52468±4920 682±66	-	-
F.T. Dw3, Dw5	370±172 19262±5633 419±98	444±149 16784±1162 222±82	444±149 17847±1152 448±133
D.P. Dw7, DwX	634±251 47026±3663 1939±641	-	-
J.R. Dw3, Dw7	-	100±9 13465±831 577±14	100±9 36583±2014 119±10
S.R. Dw7, DwX	1269±623 52545±9478 511±358	714±127 - 1163±219	237±85 61922±8148 569±36
F.D. Dw7, DwX	-	208±30 24544±3770 640±66	208±30 50486±6053 409±33
F.M. Dw2, DwX	-	613±89 28989±4795 1185±36	613±89 23377±7112 5495±438
N.C. Dw1, DwX	-	1543±475 38134±8268 892±190	1543±473 34263±7556 1115±504

TABLA 24a .- Se muestra cpm ± desviación standard para triplicados.
a-Cultivo autólogo Linfocitos-Linfocitos. b-Cultivo Mixto Linfocitos-Linfocitos (mit.C). c-Cultivo Mixto Espermatozoides-Linfocitos. 6 días de cultivo.

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS (CPM)

(RELACION E/L, 1/1)

ESPERMATOZOIDES ESTIMULADOR :

R.E. Dw7, DwX	J.D. DwX	R.A. Dw3, Dw5	J.R. Dw3, Dw7
3627±1230	3627±1230	-	-
45206±17786	43873±10773	-	-
6411±1425	8575±1635	-	-
3068±875	3068±875	-	-
19957±4000	40718±8784	-	-
4680±700	2905±741	-	-
1855±1046	1855±1046	-	-
25349±5606	-	-	-
753±304	822±140	-	-
1276±480	1276±480	-	-
-	22924±2033	-	-
1083±213	666±110	-	-
-	-	2509±497	4705±411
-	-	50792±5587	34300±2562
-	-	49791±338	2335±773
-	-	2733±281	654±316
-	-	46494±1699	3792±6379
-	-	6100±1423	263±17
-	-	401±94	1027±562
-	-	-	32524±1754
-	-	323±127	1173±573
-	-	-	-
-	-	-	1257±202
-	-	-	-
-	-	-	2114±929

LINFOCITOS RESPONDEDOR :

I.R. Dw7, DwX

J.O. Dw2, DwX

J.D. DwX

R.E. Dw7, DwX

P.A. DwX

E.A. DwX

R.A. Dw3, Dw5

J.R. Dw3, Dw7

TABLA 24b .- Igual que en la Tabla 24a.

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS (CPM)

(RELACION E/L, 5/1)

ESPERMATOZOIDES ESTIMULADOR :

	A.S. Dw2, Dw3	S.R. Dw7, DwX	J.A. Dw2, Dw5
LINFOCITOS RESPONDEDOR:			
A.S. Dw2, Dw3	382±191 - 614±104	-	-
I.C. DwX,	698±484 32163±7034 190±6	-	-
J.A. Dw2, Dw5	936±317 29844±5750 662±162	332±83 45424±1024 509±92	332±83 748±46 580±99
E.R. Dw6, Dw7	1429±606 52338±5567 1386±573	-	-
S.R. Dw7, DwX	1269±623 52545±9478 511±350	237±85 696±139 324±7	237±85 61922±8148 676±274
V.N. Dw1, DwX	-	185±88 32344±6093 603±18	185±88 37493±10496 545±202
F.D. Dw7, DwX	-	208±30 24544±3770 879±149	208±30 50486±6053 554±129
J.R. Dw3, Dw7	-	100±9 13465±831 40413	100±9 36583±2014 632±60
F.T. Dw3, Dw5	-	444±149 16734±1162 303±30	444±149 17847±1152 330±132
P.H. Dw2, DwX	-	613±89 28969±4795 746±134	613±89 23377±7112 1317±132
M.C. Dw1, DwX	-	1543±475 38134±8268 1290±179	1543±475 34263±7557 871±1
C.Q. Dw1, Dw7	-	306±241 13528±2590 1708±55	306±241 46228±1147 695±250

TABLA 25 .- Igual que en la Tabla 24a.

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS (%ESTIMULACION)

(RELACION E/L , 1/1)

ESPERMATOZOIDES ESTIMULADOR :

LINFOCITOS RESPONDEDOR:	A. S. Dw2, Dw3	S. R. Dw7, DwX	J. A. Dw2, Dw5
R. B. Dw7, DwX	-	0	-
A. S. Dw2, Dw3	<u>60,7</u>	-	-
J. A. Dw2, Dw5	-	54,5	<u>0</u>
V. N. Dw1, DwX	0	30,2	34,5
C. Q. Dw1, Dw7	0	0	35,2
A. A. Dw5, DwX	0	-	-
F. T. Dw3, Dw5	13,2	0	0
D. P. Dw7, DwX	205,8	-	-
J. R. Dw3, Dw7	-	477	19
S. R. Dw7, DwX	0	<u>62,8</u>	140
F. D. Dw7, DwX	-	207,6	96,6
P. M. Dw2, DwX	-	93,3	769
H. C. Dw1, DwX	-	0	0

TABLA 26a .- Los % de estimulación se calcularon tal y como se indica en Materiales y Metodos(pag.96).

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS (%ESTIMULACION)

(RELACION E/L , 1/1)

ESPERMATOCOIDES ESTIMULADOR :

LINFOCITOS RESPONDEDOR :

	R.B. Dw7, DwX	J.D. DwX	R.A. Dw3, Dw5	J.R. Dw3, Dw7
I.R. Dw7, DwX	76,7	136,4	-	-
J.O. Dw2, DwX	52,5	0	-	-
J.D. DwX	0	0	-	-
R.B. Dw7, DwX	0	0	-	0
P.A. DwX	-	-	98,4	0
E.A. DwX	-	-	119,1	14,2
R.A. Dw3, Dw5	-	-	0	-
J.R. Dw3, Dw7	-	-	-	<u>68,1</u>

TABLA 26b .- Igual que en la Tabla 26a.

CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES - LINFOCITOS (% ESTIMULACION)
(RELACION E/L , 5/1)

ESPERMATOZOIDES ESTIMULADOR :

LINFOCITOS RESPONDEDOR:	A. S. Dw2, Dw3	S. R. Dw7, DwX	J. A. Dw2, Dw5
A. S. Dw2, Dw3	<u>60,7</u>	-	-
I. C. DwX,	0	-	-
J. A. Dw2, Dw5	0	53,3	<u>74,6</u>
E. R. Dw6, Dw7	0	-	-
S. R. Dw7, DwX	0	<u>36,7</u>	185,2
V. N. Dw1, DwX	-	225,9	196,2
F. D. Dw7, DwX	-	322,5	166,3
J. R. Dw3, Dw7	-	304	532
F. T. Dw3, Dw5	-	0	0
P. M. Dw2, DwX	-	21,6	114,8
M. C. Dw1, DwX	-	0	0
C. Q. Dw1, Dw7	-	458,1	127

TABLA 27 .- Igual que en la Tabla 26a

CORRELACION ENTRE LA RESPUESTA EN EL CULTIVO MIXTO
ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS Y LA ESPERADA DEL FENO-
TIPO HLA-D DE LOS INDIVIDUOS UTILIZADOS.

(RELACION E/L , 1/1)

FENOTIPO HLA-D DONANTES ESPERMATOZOILES

Dw2, Dw3
Dw7, DwX
Dw2, Dw5
Dw7, DwX
DwX
Dw3, Dw5
Dw3, Dw7

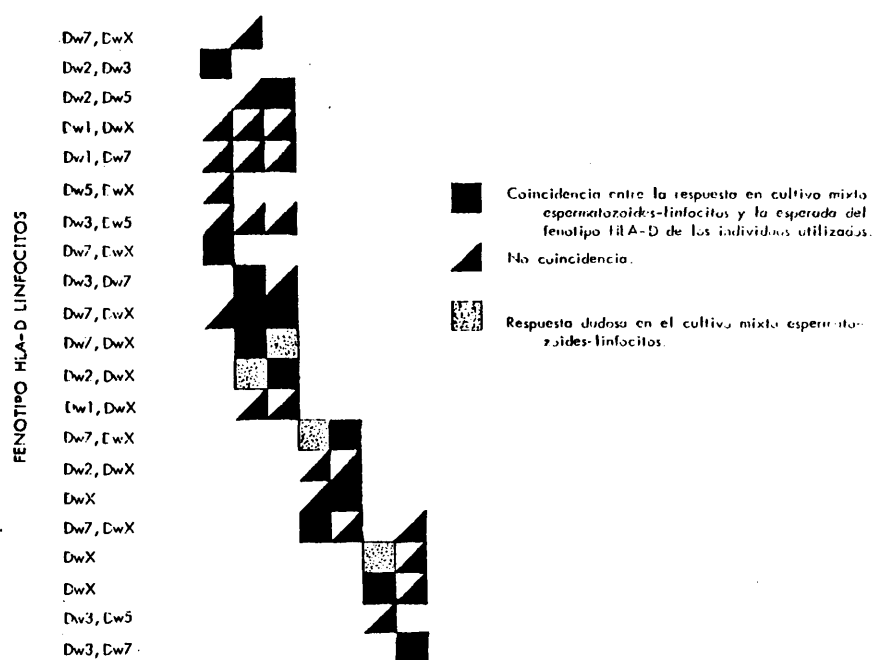


FIGURA 15. - El valor de χ^2 para la tabla de contingencia 2x2 entre la respuesta en cultivo mixto espermatozoides-linfocitos y la esperada del fenotipo HLA-D de los individuos utilizados es de 2,014 ($p > 0,05$). El coeficiente de correlacion, r ; calculado como

$$r = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}}$$

, siendo n el numero de combina-

ciones realizadas, es de 0.233.
No existe, por lo tanto, correlacion entre la respuesta en el cultivo mixto linfocitos-espermatozoides y la esperada del fenotipo HLA-D de los individuos utilizados.

CORRELACION ENTRE LA RESPUESTA EN EL CULTIVO MIXTO
ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS Y LA ESPERADA DEL FENO-
TIPO HLA-D DE LOS INDIVIDUOS UTILIZADOS.

(RELACION E/L , 5/1)

FENOTIPO HLA-D DONANTES ESPERMATOZOIDES

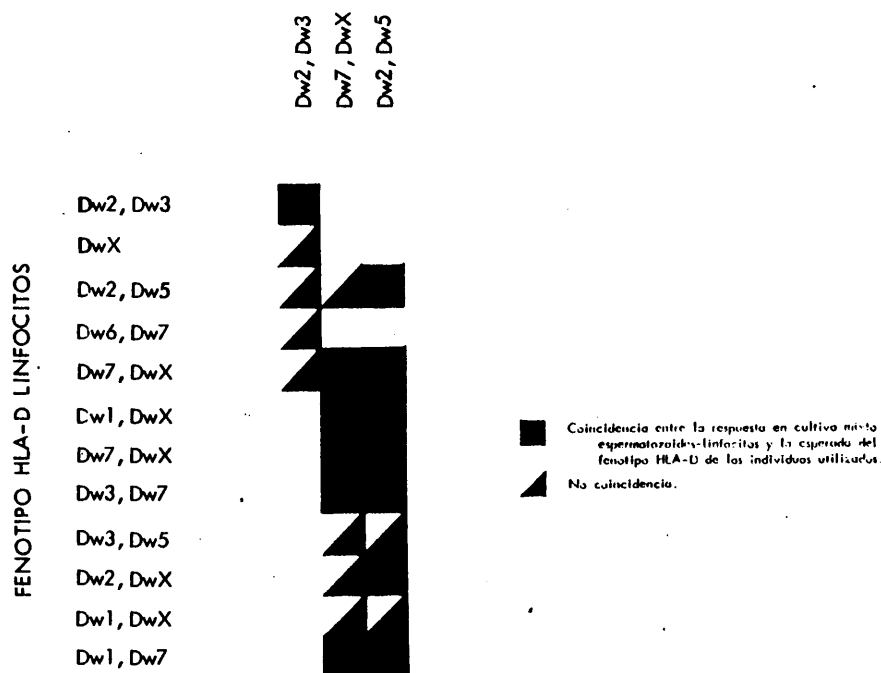


FIGURA 16.- El valor de χ^2 para la tabla de contingencia 2x2 entre la respuesta en cultivo mixto espermatozoides-linfocitos y la esperada del fenotipo HLA-D de los individuos utilizados es de 2,65 ($p > 0,05$). El coeficiente de correlacion , r ; calculado como

$r = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}}$, siendo n el numero de combinaciones realizadas, es de 0,339.

No existe, por lo tanto, correlacion entre la respuesta en el cultivo mixto linfocitos-espermatozoides y la esperada del fenotipo HLA-D de los individuos utilizados.

4. -EXPRESION EN CELULAS SEMINALES NO ESPERMATOZOIDES (C.S. no E.) DE PRODUCTOS HLA-D.

En la Tabla 28 se muestran las cpm correspondientes a los cultivos mixtos linfocitos-C.S. no E. utilizando individuos de fenotipo HLA-D conocido, y se comparan con las cpm obtenidas utilizando los linfocitos (Mit.C) del mismo individuo como células estimuladoras, y con las cpm obtenidas en los cultivos mixtos autólogos linfocitos-linfocitos.

En la Tabla 29 se indican los % de estimulación para cada combinación linfocitos-C.S. no E. Las dos combinaciones autólogas mostraban un 62,5% y un 24% de estimulación, respectivamente. De las 13 combinaciones alogénicas, una mostraba estimulación del 25,2% y otra del 86,5%. Las 11 combinaciones alógenicas restantes presentaban % de estimulación superiores a 100%, incluso en 3 casos superiores a 1.000%.

En la Figura 17 se muestra un damero similar a los presentados anteriormente para el caso de los cultivos mixtos espermatozoides-linfocitos. Como puede observarse, la respuesta en cultivo mixto a C.S. no E. muestra una correlación de $r=0,78$ con lo que se esperaría si las estimulaciones se debieran al reconocimiento de aloantígenos HLA-D. Los criterios que se siguieron para la asignación de las respuestas fueron, en este caso, los mismos que se utilizaron para los cultivos mixtos espermatozoides-linfocitos. (Véase apartado anterior).

CULTIVO MIXTO LINFOCITOS -C.S.no E. (CPM)

C.S. no E. ESTIMULADOR :

LINFOCITOS RESPONDEDOR:	A.S. Dw2,Dw3	S.R. Dw7,DwX
V.N. Dw1,DwX	875±692 54559±1396 2385±123	185±88 32344±6093 7842±281
C.Q. Dw1,Dw7	343±170 59512±9217 1048±329	306±241 13528±2590 958±316
A.A. Dw5,DwX	1203±280 52468±4920 3280±1122	-
D.P. Dw7,DwX	844±142 59801±7499 1970±749	-
S.R. Dw7,DwX	891±266 86765±7317 6276±577	237±85 696±139 294±41
A.S. Dw2,Dw3	400±200 - 650±200	-
J.A. Dw2,Dw5	-	332±83 45424±1024 4234±154
F.D. Dw7,DwX	-	208±30 24544±3770 3009±681
J.R. Dw3,Dw7	-	100±9 13465±831 738±69
F.T. Dw3,Dw5	-	444±149 16784±1162 501±130
P.H. Dw2,DwX	-	613±89 28969±4795 5532±795
H.C. Dw1,DwX	-	1543±475 38139±8268 2879±192

TABLA 28.- Se muestra cpm ± desviación standard para triplicados.
a- Cultivo autólogo linfocitos-linfocitos. b- Cultivo Mixto linfocitos-linfocitos (mit.C) . c- Cultivo Mixto linfocitos - C.S. no E.
6 días de cultivo. Relación L/C.S.no E. y L/mit.C : 1/1.

CULTIVO MIXTO LINFOCITOS - C.S. no E. (% ESTIMULACION)

C.S. no E. ESTIMULADOR :

LINFOCITOS RESPONDEDOR:	A.S. Dw2,Dw3	S.R. Dw7,DwX
V.N. Dw1,DwX	172,8	4138,9
C.Q. Dw1,Dw7	205,5	211,1
A.A. Dw5,DwX	172,6	-
D.P. Dw7,DwX	133,4	-
S.R. Dw7,DwX	604,3	<u>24,0</u>
A.S. Dw2,Dw3	<u>62,5</u>	-
J.A. Dw2,Dw5	-	1175
F.D. Dw7,DwX	-	1346,6
J.R. Dw3,Dw7	-	638
F.T. Dw3,Dw5	-	25,2
P.M. Dw2,DwX	-	802,6
H.C. Dw1,DwX	-	86,5

TABLA 29. - Los % se calcularon tal y como se indicó en Materiales y Metodos(pag.98). Relacion L/C.S.no E. : 1/1. 6  dia de cultivo.

CORRELACION ENTRE LA RESPUESTA EN EL CULTIVO MIXTO
C.S. no E. - LINFOCITOS Y LA ESPERADA DEL FENOTIPO
HLA-D DE LOS INDIVIDUOS UTILIZADOS.

FENOTIPO HLA-D DONANTES C.S. no E.

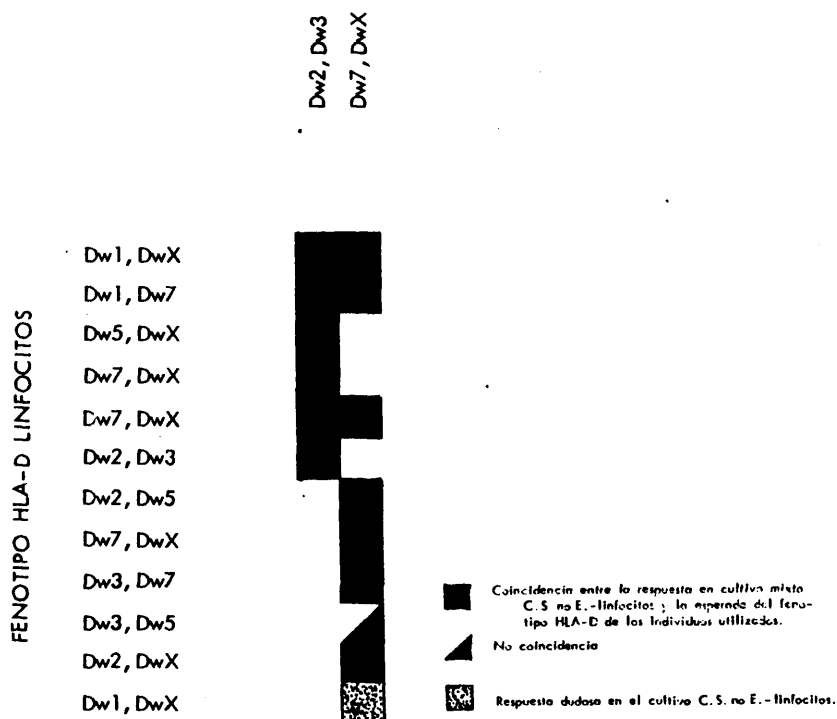


FIGURA 17.- El valor de χ^2 para la tabla de contingencia 2x2 entre la respuesta en cultivo mixto C.S. no E.-linfocitos y la esperada del fenotipo HLA-D de los individuos utilizados es de 8,55 ($p < 0,005$). El coeficiente de correlacion, r ; calculado como

$$r = \sqrt{\frac{\chi^2}{n}}$$

, siendo n el numero de combinaciones realizadas, es de 0,78.

Hay, por lo tanto, correlacion entre la respuesta en el cultivo mixto C.S. no E.-linfocitos y la esperada del fenotipo HLA-D de los individuos utilizados.

DISCUSSION

1.- EXPRESION SELECTIVA DE LOS ANTIGENOS HLA-A,-B,-C,-Bw4,Bw6 Y DE BF
EN ESPERMATOZOIDES: GENES VECINOS DE EXPRESION ALTERNANTE.

A) EXPRESION DE ANTIGENOS HLA-A Y HLA-B.

- Citotoxicidad especifica de sueros anti-HLA-A y anti-HLA-B sobre esper-
matozoides.

Nuestros resultados coinciden con aquellos presentados por otros autores, Fellous y Dausset, 1970; Kerek et al., 1972, Arnatz-Villena y Festenstein, 1976; Festenstein et al., 1978, que han utilizado técnicas similares de citotoxicidad, de que los antígenos HLA-A y HLA-B están presentes en la superficie de los espermatozoides. Tablas 1 y 3.

La validez de este método para detectar antígenos HLA en la superficie de los espermatozoides y su sensibilidad hacen que las técnicas de citotoxicidad directa mediada por complemento, con tinción posterior especifica de los espermatozoides vivos y de los muertos, sean las más apropiadas para esta tarea.

La validez del método de ensayo empleado está garantizada por la elevada supervivencia de los espermatozoides después del ensayo en los controles negativos (superior al 80%), donde el suero anti-HLA se sustituye por suero AB Rh⁺, y en los ensayos donde el suero anti-HLA iba dirigido contra una especificidad HLA que no poseía el individuo donante de los espermatozoides, y en donde la supervivencia era similar a la que presentaban los controles negativos.

La sensibilidad del método se debe a la ausencia de "fondo" después del ensayo, menos de un 20% de espermatozoides muertos inespecíficamente, y a la facilidad de distinguir los espermatozoides vivos de los muertos gracias al

empleo de tinción específica de estas dos poblaciones. (Verde: vivos; roja: muertos).

Los bajos porcentajes de espermatozoides muertos, alrededor de 1/3 de los espermatozoides totales, empleando sueros anti-HLA-A o anti-HLA-B puede interpretarse en función de la posible expresión haploide de estos productos en la superficie de los espermatozoides (Fellous y Dausset, 1970; Arnaiz-Villena y Festenstein, 1976; Festenstein et al., 1978).

La posibilidad de que la citotoxicidad de estos sueros se debiera a actividades diferentes de las actividades anti-HLA, queda descartada: 1) por la especificidad de esta muerte; donde los sueros anti-HLA-A y anti-HLA-B matan específicamente los espermatozoides de aquellos individuos que poseen la actividad HLA-A o HLA-B relevante y no matan los espermatozoides de otros individuos que son negativos para estas especificidades (Tablas 1 y 3) y 2) por los experimentos de absorción con preparaciones purificadas de membranas de hígado de rata; donde se demuestra que, efectivamente, en algunos sueros anti-HLA existe actividad inespecífica anti-espermatozoides y que después de eliminar esta actividad los sueros matan específicamente los espermatozoides de aquellos individuos que poseen la especificidad HLA relevante y no otros espermatozoides. Tabla 7.

Aunque nosotros no hemos realizado experimentos en el sentido de descartar que las actividades HLA-A y HLA-B detectadas se debieran a restos de antígenos presentes en la célula madre de los espermatozoides, que pudiera implicar que solo aquellos espermatozoides más jóvenes presentaran antígenos HLA (Goldberg et al., 1970), justificando así el bajo porcentaje de espermatozoides HLA-A o HLA-B positivos encontrado por nosotros, los experimentos en los que se demuestra expresión haploide parecen descartar esa posibilidad. Además, si este hecho fuera la razón principal de la presencia de antígenos HLA en espermatozoides, deberíamos esperar que aparecieran en estas células otros antígenos HLA aparte de HLA-A y HLA-B (véase más adelante), cosa que no sucede.

La presencia de antígenos HLA en plasma seminal ha sido estudiada por varios autores. Mittal, 1975, encuentra estos antígenos HLA-A y HLA-B en plasma seminal de solo algunos individuos (¿secretores?), mientras que Law y Bodmer, 1978, no detectan cantidades apreciables de estos antígenos en plasma seminal. La posibilidad de que los antígenos HLA-A y HLA-B detectados por nosotros se debieran principalmente a antígenos HLA presentes en el plasma seminal que se hubieran pegado a la superficie de los espermatozoides se descarta en función de los siguientes hechos:

- 1.- La presencia de estos antígenos HLA en plasma seminal es actualmente discutida; parece que solo algunos individuos (¿secretores?) presentarían estos antígenos en plasma seminal, mientras que la presencia de antígenos HLA-A y HLA-B en espermatozoides ha sido general a todos los individuos estudiados por nosotros.
- 2.- La expresión haploide de estos productos descarta, asimismo, la posibilidad de adsorción de antígenos HLA a espermatozoides.
- 3.- La distribución de los antígenos HLA-A y HLA-B en la membrana de los espermatozoides está limitada a una zona muy determinada en posición post-acrosomal de la cabeza del espermatozoide (Halim et al., 1974). Hecho que contrasta con la distribución de β_2 -microglobulina que aparece en distintos puntos de la superficie de los espermatozoides (Fellous et al., 1976). La presencia de β_2 -microglobulina en espermatozoides se ha demostrado que se debe principalmente a la adsorción de ésta proteína que está presente en el plasma seminal, donde es uno de los componentes principales; además, se encuentra probablemente en forma libre, no asociada a cadenas pesadas de los antígenos HLA-A,-B,-C (Law y Bodmer, 1978).
- 4.- Los % de espermatozoides muertos en ensayos de citotoxicidad deberían ser mayores que los encontrados por nosotros si estos antígenos se adsorbieran del plasma seminal.
- 5.- En experimentos de citotoxicidad lavando progresivamente los espermatozoides, se encuentra que la actividad de los sueros, estimada como % de espermato-

zoides muertos en el ensayo, no disminuye con el número de lavados (Rodríguez de Córdoba y Arnaiz Villena, resultados no publicados).

- Los experimentos de absorción de sueros anti-HLA-A, HLA-B confirman los resultados obtenidos en los experimentos de citotoxicidad.

Los experimentos de absorción utilizando preparaciones de espermatozoides purificados y los mismos sueros anti-HLA-A y anti-HLA-B utilizados en los experimentos de citotoxicidad confirman los resultados obtenidos en estos últimos experimentos.

Nuestros resultados en experimentos de absorción de sueros anti-HLA-A y HLA-B coinciden con los resultados obtenidos por otros autores (Kerek et al., 1972; Festenstein et al., 1980).

La absorción de sueros anti-HLA-A o anti-HLA-B es específica, en el sentido de que solo absorben la especificidad anti-HLA los espermatozoides de individuos que poseen la especificidad HLA-A o HLA-B relevante y no otros espermatozoides. Este hecho descarta la posibilidad de que la disminución de la actividad en los sueros absorbidos pudiera ser debida a inhibición inespecífica por las preparaciones de espermatozoides; por ejemplo, actividad anticomplementaria. Además, la absorción es dependiente del número de células empleadas. Tablas 2,4,5 y 6; Figuras 1,2 y 3.

Preparaciones de espermatozoides de algunos individuos parecen absorber mejor que otras las actividades presente en algunos sueros anti-HLA. Este punto puede explicarse perfectamente en función de que algunos de los sueros utilizados abarcan varias especificidades anti-HLA, y del fenotipo HLA de los individuos donantes de los espermatozoides. La presencia de antígenos HLA con reacción cruzada para estas especificidades HLA presentes en los sueros, seguramente es la razón de la mayor o menor absorción de los sueros anti-HLA por preparaciones de espermatozoides purificados.

Un punto sobre el que es necesario llamar la atención es el de que nuestras preparaciones de espermatozoides habían sido purificados previamente, eliminando toda célula seminal no espermatozoide, a diferencia de las preparaciones utilizadas por otros autores con anterioridad.

La cantidad de antígenos HLA-A y HLA-B presente en estas células, según se deduce de nuestros resultados, es superior a la que presentan los espermatozoides. La presencia de estas células seminales no espermatozoides en las preparaciones de espermatozoides, con toda seguridad ha llevado consigo sobreestimar la cantidad de antígenos HLA-A y HLA-B que, aunque por supuesto detectables en los espermatozoides, deben de estar en una cantidad relativamente pequeña.

A este respecto, hay que señalar, que mientras que 8×10^4 linfocitos son capaces de eliminar por completo la actividad anti-HLA-A o anti-HLA-B de sueros (1 μ l) diluidos a su "end point", es necesario utilizar cantidades muy superiores, 10×10^6 espermatozoides, para absorber la actividad anti-HLA-A o anti-HLA-B de cantidades similares de estos mismos sueros diluidos a su "end point" y, en algunas ocasiones, incluso estas cantidades no son capaces de absorber la totalidad de la actividad anti-HLA-A o anti-HLA-B. La presencia de células seminales no espermatozoides aumenta considerablemente la capacidad de absorción de actividades anti-HLA-A o anti-HLA-B por las preparaciones de espermatozoides. Tablas 14 y 15.

Así pues, en conclusión, nuestros resultados indican claramente que los antígenos HLA-A y HLA-B se encuentran presentes en la superficie de los espermatozoides, aunque en menor cantidad que en linfocitos o que en otras células seminales diferentes de los espermatozoides.

B) NO DETECCION DE ANTIGENOS HLA-C, NI DE ANTIGENOS HLA-Bw4, Bw6 EN ESPERMATOZOIDES.

Nuestros resultados demuestran claramente que antisueros anti-HLA-C o anti-HLA-Bw4, Bw6 no matan apreciablemente los espermatozoides de individuos que poseen las actividades correspondientes, en experimentos de citotoxicidad mediada por complemento, contrariamente a lo que sucedía cuando se utilizaban antisueros anti-HLA-A o anti-HLA-B. Tablas 8 y 10.

En este sentido, nuestros resultados coinciden con los preliminares de Festenstein et al., 1978, que habían encontrado que antisueros anti-HLA-C no detectaban la presencia de antígenos HLA-C en los espermatozoides de dos individuos diferentes.

Preparaciones purificadas de espermatozoides tampoco absorben estas actividades de sueros anti-HLA-C o anti-HLA-Bw4, Bw6 diluidos a su "end point". Tablas 9 y 11.

Los antígenos HLA-C o HLA-Bw4, Bw6 pueden, sin embargo, detectarse en otras células seminales no espermatozoides, según se puede observar claramente cuando en lugar de espermatozoides purificados se utilizan células seminales totales (espermatozoides más otras células seminales) en la absorción de sueros anti-HLA-C o anti-HLA-Bw4, Bw6. Tablas 16 y 17.

El hecho de que los antígenos HLA-A, -B, -C, -Bw4, Bw6 estén presentes en células seminales no espermatozoides, na sorprende, ya que en estas estirpes celulares (células epiteliales de descamación de las vías urinarias, linfocitos y macrófagos) se ha encontrado la presencia de dichos antígenos HLA (véase en la Introducción, Distribución Tisular de los Antígenos HLA).

La presencia de antígenos HLA-C en la superficie celular se ha demostrado que es menor que la de los antígenos HLA-A y HLA-B (Snary et al., 1977). Dado que la cantidad de antígenos HLA-A y HLA-B en la superficie de los espermatozoides es pequeña, cabe la posibilidad de que la cantidad de antígenos HLA-C en los espermatozoides sea tan baja que escape a la capacidad de detección de las técnicas empleadas por nosotros. Tal vez en este caso sería interesante la utilización de técnicas de "binding" empleando anticuerpos anti-HLA-C marcados con I^{125} , (técnica de mayor sensibilidad que ha sido utilizada en otras ocasiones para la detección de antígenos HLA-DR en espermatozoides; véase más adelante), para resolver esta cuestión. Sin embargo, hay que señalar, que uno de los sueros anti-HLA-C utilizado en los experimentos de citotoxicidad, el Bw05xD₀₃⁰² (Cw4), era uno de los más fuertes de que disponíamos con un "end point" de 1/10.

La ausencia de determinantes Bw4, Bw6 y no de antígenos HLA-B en la superficie de los espermatozoides es más difícil de explicar.

No cabe en este caso justificar esta ausencia en función de no detección debida a la poca cantidad de estos antígenos HLA-Bw4, Bw6 en la membrana de los espermatozoides, ya que para aquellos individuos homocigotos Bw4, Bw4 o Bw6, Bw6, la cantidad de estos antígenos, sean o no parte de la misma molécula que los determinantes HLA-B, es el doble de la de los antígenos HLA-B, que se detectan claramente en los espermatozoides. Además, un suero el HINCHCLIFFE (Bw6) era el suero más fuerte de los que disponíamos ("end point" 1/20).

Podemos, sin embargo, proponer dos explicaciones, no excluyentes entre sí de estos hechos. Según éstas: 1) los determinantes HLA-B y HLA-Bw4, Bw6, presentes o no en la misma molécula, pueden estar codificados por genes distintos, expresándose solo los que corresponden a las especificidades HLA-B en los espermatozoides, y 2) la disposición de las moléculas que contienen los determinantes HLA-B en los espermatozoides puede ser diferente a la que presentan otras células, llevando a la desaparición de la disposición estructural de estas moléculas que como se

ha sugerido (Grumet et al., 1978), sería la responsable de los determinantes antigénicos Bw4, Bw6, o enmascarando estos determinantes Bw4, Bw6.

El cualquier caso, un aspecto interesante de esta no detección de los determinantes Bw4, Bw6 en los espermatozoides es la posibilidad de utilizar estas células para distinguir sueros poliespecíficos anti-HLA-B de auténticos sueros anti-HLA-Bw4, Bw6, tarea a menudo difícil de realizar.

En conclusión, no aparecen en la superficie de los espermatozoides antígenos codificados por los loci HLA-C y HLA-Bw4, Bw6.

C) AUSENCIA DE FACTOR B EN LOS ESPERMATOZOIDES.

Dentro del Complejo Principal de Histocompatibilidad existen genes que codifican para componentes del complemento. La posibilidad de que durante la espermatogenesis se diera una expresión simultánea de los productos codificados por el Complejo Principal de Histocompatibilidad ha sido analizada por Erickson, 1977, en el ratón.

Nosotros no hemos podido detectar la presencia de actividad de Factor B ni en plasma seminal, ni en espermatozoides. Estos resultados coinciden con los de Erickson en el sentido de que él tampoco encontró la presencia de productos codificados por otros loci diferentes de los que codifican para los antígenos de histocompatibilidad en los espermatozoides del ratón. Figura 5.

Concluimos, por tanto, que los espermatozoides no poseen Factor B de la vía alternativa de activación del complemento.

Parece, por tanto, probable que la expresión de productos codificados por loci vecinos en el Sistema HLA se produzca de un modo selectivo en los espermatozoides, expresándose los productos de algunos loci, HLA-A y HLA-B y no los de otros; entre los que se incluirían los correspondientes a la región HLA-D/DR (véase más adelante).

2.- ESTIMULACION DE LINFOCITOS EN CULTIVO MIXTO ESPERMATOZOIDES-LINFOCITOS: SU IRREGULARIDAD Y POSIBLES CAUSAS.

Dos grupos diferentes de investigadores han presentado pruebas de que preparaciones de espermatozoides son capaces de estimular a linfocitos alogénicos en cultivo mixto espermatozoides-linfocitos.

El grupo de Levis (Levis et al., 1975, 1976) encuentran que estas estimulaciones son similares a las encontradas en el cultivo mixto de linfocitos, con un máximo de estimulación en el día 4º del cultivo; el grupo de Festenstein (Halim y Festenstein, 1975; Festenstein et al., 1977, Festenstein y Halim, 1978) por el contrario encuentran estimulaciones mucho menores, que en muchos casos no superan el doble del valor de los controles autólogos, con un máximo en el día 6º del cultivo. Ambos grupos realizaron principalmente sus experimentos con relaciones espermatozoides/linfocitos de 1/1, y ambos, además, comunican la existencia de distintas cantidades de células seminales no espermatozoides contaminando sus preparaciones de espermatozoides.

Nuestros resultados, utilizando preparaciones purificadas de espermatozoides donde no había contaminación detectable de otras células seminales, demuestran, contrariamente a los resultados comunicados previamente, que los espermatozoides no estimulan, o lo hacen, con algunas excepciones, muy débilmente a los linfocitos alogénicos en cultivo mixto espermatozoides-linfocitos. Figuras 6a, 7a, 8a, 10, 11 y 12. Tablas 26a, 26b y 27.

Las estimulaciones encontradas por nosotros son generalmente equiparables a las que presentan los controles autólogos linfocitos-linfocitos o a los de los cultivos mixtos autólogos espermatozoides-linfocitos, aun a pesar de que los linfocitos (Mit.C) de los donantes de los espermatozoides estimulaban clara e intensamente a los linfocitos utilizados como respondedores en el cultivo mixto espermatozoides-linfocitos. Figuras 6b, 7b, 8b y 13. Tablas 24a, 24b y 25.

Solo en algunas pocas ocasiones estas estimulaciones por parte de los espermatozoides eran claramente positivas.

Las estimulaciones positivas por los espermatozoides no guardaban relación con el número de espermatozoides utilizados en el cultivo mixto ni con el tiempo de cultivo, según se pudo observar cuando se realizaron curvas de tiempo o de concentración utilizando los mismos linfocitos respondedores y los mismos espermatozoides como estimuladores.

Estas estimulaciones son además independientes de la expresión de productos ligados al sexo, antígeno H-Y, y/o productos codificados por la región HLA-D/DR (véase más adelante) según pudo comprobarse cuando se analizó por separado la estimulación de linfocitos pertenecientes a donantes masculinos o femeninos por los espermatozoides. Figura 9.

Las elevadas estimulaciones encontradas por el grupo de Levis parecen poder explicarse completamente por la presencia de células seminales no espermatozoides, que contaminarían sus preparaciones de espermatozoides.

En este sentido, nuestros resultados muestran, sin lugar a dudas, que las células seminales no espermatozoides purificadas son capaces de estimular claramente a linfocitos alogénicos en cultivo mixto. Figura 14. Tabla 29.

Este hecho coincide con los resultados presentados por Misko et al., 1978, en los que demostraban que las células seminales presentes en el semen de individuos vasectomizados, donde no hay espermatozoides, estimulaban a los linfocitos alogénicos en cultivo mixto. Hay que señalar, además, que los % de estimulación calculados a partir de las cpm comunicadas por estos autores en sus resultados, coinciden con los % de estimulación encontrados por nosotros utilizando células seminales no espermatozoides obtenidas del semen de individuos normales, Tabla 29. Seguramente se trata, además, de los mismos tipos celulares.

Aunque algunas de las estimulaciones encontradas por el grupo de Festenstein pudieran tener su justificación en la presencia de células seminales no espermatozoides contaminando sus preparaciones de espermatozoides, en general, sus resultados son más similares a los nuestros. Sin embargo, la posibilidad de que estas estimulaciones se debieran a determinantes HLA-D como indican estos autores no parece probable; según se puede deducir cuando se comparan estas estimulaciones con las provocadas por los linfocitos (Mit. C) de estos mismos donantes de los espermatozoides sobre los mismos linfocitos respondedores utilizados en el cultivo mixto (véase más adelante).

En cualquier caso, la presencia de células seminales no espermatozoides contaminando las preparaciones de espermatozoides utilizadas en el cultivo mixto espermatozoides-linfocitos es importante a la hora de interpretar las estimulaciones encontradas en este tipo de cultivo, máxime si como hemos demostrado, estas células seminales no espermatozoides son capaces por sí solas de provocar estimulaciones considerables de linfocitos alogénicos en cultivo mixto. Figura 14. Tabla 29.

En conclusión, podemos decir que cuando se utilizan preparaciones de células seminales totales (espermatozoides y otras células seminales) para estimular linfocitos alogénicos en cultivo mixto, las células que parecen principales responsables de estas estimulaciones son las células seminales no espermatozoides.

Y que las ocasionales estimulaciones encontradas con preparaciones pu-

rificadas de espermatozoides no parecen ser debidas a determinantes HLA-D (véase más adelante) o a productos ligados al sexo, pudiendo estar implicados otros sistemas genéticos codificados dentro o fuera del Sistema HLA.

3.- CORRELACION DE LOS ANTIGENOS HLA-D Y HLA-DR: EN POBLACION Y EN LAS CELULAS.

A) CORRELACION ENTRE LOS ANTIGENOS HLA-D Y HLA-DR EN UNA MUESTRA DE LA POBLACION ESPAÑOLA.

En general, se ha encontrado una buena correlación HLA-D/HLA-DR en todas las poblaciones estudiadas.

Nuestros resultados de la correlación HLA-D/HLA-DR en la población española se muestran en la Tabla 23. Tres parejas de antígenos muestran una baja correlación: Dw3/DR3, Dw4/DR4 y Dw6/DRw6.

Como ocurre en otras poblaciones la mayor parte de las discrepancias D/DR se enmarcan dentro del tipo Dw-/DR+, lo que indicaría que las especificidades HLA-DR son en cierto modo más amplias que las correspondientes HLA-D. Además, si se analiza individuo por individuo uno puede darse cuenta de que la mayor parte de estos Dw- corresponden a blancos; casos en los que no se pudo asignar ninguna de las 7 especificidades HLA-D estudiadas por nosotros.

La mayor parte de los estudios de los determinantes HLA-D se han realizado en poblaciones caucásicas centroeuropeas o americanas. Esto podría implicar que las especificidades HLA-D definidas en la actualidad correspondieran a determinadas subdivisiones de estos antígenos HLA-D, que explicaría porqué las especificidades HLA-D definidas en la actualidad son más cortas que las correspondientes HLA-DR.

La dificultad del tipaje HLA-D en cultivo mixto, donde no solo estimulan los determinantes HLA-D, debe tenerse en cuenta en nuestro caso, dado que nosotros hemos utilizado como células homocigotas de tipaje células procedentes de una población diferente a la nuestra y que además se agrava por el hecho de que no nos ha sido posible tipar nuestra población más que con una sola célula homocigota para cada especificidad HLA-D. La medida en que estas cuestiones hayan influido en el tipaje HLA-D realizado por nosotros la desconocemos, pero creemos que debe tenerse en cuenta a la hora de considerar la baja correlación encontrada para algunas parejas de antígenos HLA-D/HLA-DR. Hay que señalar, sin embargo, que la correlación HLA-D/HLA-DR a nivel individual, con algunas excepciones, es bastante buena y que en otras poblaciones se han encontrado los mismos problemas de correlación HLA-D/HLA-DR (Troup et al., 1978; Troup et al., 1979).

El tamaño de nuestra muestra es otro factor a considerar, sobre todo a la hora de correlacionar antígenos que aparecen en una frecuencia muy baja en nuestra población, como es el caso de HLA-Dw4 y HLA-Dw6. Tabla 19.

Por último, un hecho a tener en cuenta respecto al análisis de la correlación de los antígenos HLA-D y HLA-DR lo constituye el caso de la asociación de esos antígenos con antígenos codificados por otros loci, en concreto el locus HLA-B.

En este sentido, hay que señalar que al igual que el antígeno HLA-DR5 está asociado a HLA-B40 en nuestra población (Arnaiz Villena et al., 1981a), contrariamente a lo que ocurre en otras poblaciones, también HLA-Dw5 está asociado a HLA-B40 en la población española (Tabla 22), mientras que como ocurría para HLA-DR5, este antígeno HLA-Dw5 está asociado a otros antígenos diferentes en otras poblaciones estudiadas (Terasaki et al., 1980).

Nuestros resultados deben considerarse como preliminares. La obtención de células homocigotas de tipaje de individuos pertenecientes a nuestra población, así como un mayor tamaño de la muestra empleada permitirán completar y solucionar alguna de estas cuestiones planteadas.

En cualquier caso, se encuentra en general, una buena correlación, con algunas excepciones, entre las especificidades HLA-D y HLA-DR en la población española, siendo un dato más a favor de este hecho el que HLA-Dw5 y HLA-Dw7 son los antígenos HLA-D más frecuentes en la población española (Tabla 19), coincidiendo con que HLA-DR5 y HLA-DR7 son asimismo los antígenos HLA-DR más frecuentes en la población española (Arnaiz Villena et al. 1981a).

B) AUSENCIA DE PRODUCTOS DE LA REGION HLA-D/DR EN ESPERMATOZOIDES.

- Ausencia de antígenos HLA-DR en espermatozoides

Aunque se han presentado pruebas de la existencia de antígenos Ia (codificados por la región I, equivalente a la región HLA-D/DR en el hombre) en los espermatozoides del ratón, la presencia de antígenos HLA-DR en los espermatozoides humanos no ha sido confirmada.

La capacidad estimuladora de los espermatozoides encontrada por algunos autores (discutida anteriormente) junto con estos hechos encontrados en el ratón de la expresión de antígenos Ia fueron considerados por muchos como pruebas suficientes a favor de la presencia de antígenos HLA-DR en espermatozoides humanos.

Sin embargo, en estudios preliminares, ni Dausset et al., 1980, utilizando anticuerpos monoclonales anti-HLA-DR, ni Tosi (Ferrara, 1980) utilizando técnicas de "binding" mediante el empleo de anticuerpos anti-HLA-DR marcados con 125 , han detectado la presencia de estos antígenos en espermatozoides humanos.

Nuestros resultados en experimentos de citotoxicidad sobre espermatozoides utilizando sueros anti-HLA-DR demuestran que estos sueros no matan los espermatozoides significativamente (Tabla 13). Hechos que coinciden plenamente con los resultados obtenidos en las absorciones de sueros anti-HLA-DR por preparaciones purificadas de espermatozoides, en los que se observa claramente que la actividad anti-HLA-DR no se modifica apreciablemente después de esta absorción con espermatozoides. (Figuras 2 y 4).

Los sueros anti-HLA-DR normalmente se absorben con plaquetas previamente para eliminar otras actividades anti-HLA diferentes de las HLA-DR. Es muy posible que las pequeñas actividades citotóxicas observadas en algunos de estos sueros en los experimentos de citotoxicidad sobre espermatozoides (Tabla 13), dado que son inespecíficas, se deban a otras actividades anti-HLA residuales.

Los resultados presentados por Festenstein et al., 1980, de que la absorción con preparaciones de espermatozoides de sueros anti-HLA-DR parecía disminuir la actividad de estos sueros cuando se realizaba en proporciones superiores a 17×10^6 espermatozoides/ μ l de suero, pueden ser interpretadas como absorción inespecífica, dilución (no presentaban ningún tipo de control para descartar estas posibilidades) o más sencillamente a la presencia de células seminales no espermatozoides HLA-DR positivas, que según ellos, contaminaban sus preparaciones, y que para esas cantidades celulares que utilizaban constituyen, sin duda, un número considerable.

Los antisueros utilizados por Hammerling et al., 1975, y con los que demostraron la presencia de antígenos Ia en los espermatozoides del ratón, eran poliespecíficos y dirigidos contra toda la región I^k o I^s . En este sentido, cabe la posibilidad de que, aún cuando se considere la homología de las regiones I y HLA-D/DR, este tipo de antígenos Ia que aparecen en los espermatozoides de ratón no tengan nada que ver con los antígenos HLA-DR detectados en el hombre.

En conclusión nuestros resultados demuestran que los antígenos HLA-DR no están presentes en los espermatozoides.

- Ausencia de determinantes HLA-D en espermatozoides

El estudio del conjunto de las estimulaciones de linfocitos alogénicos para el locus HLA-D por preparaciones purificadas de espermatozoides no se correlaciona con las estimulaciones que cabrían esperarse si las estimulaciones se debieran a la presencia de determinantes HLA-D en la superficie de los espermatozoides para ninguna de las relaciones espermatozoides/linfocitos estudiadas por nosotros, contrariamente a los resultados encontrados por Festenstein y Halim, 1978. Figuras 15 y 16.

Estos autores utilizan, en nuestra opinión, un nivel muy bajo de % de estimulación para considerar el cultivo mixto espermatozoides-linfocitos positivo. Consideran este cultivo mixto positivo cuando las estimulaciones son superiores al 35% del valor del control autólogo linfocitos-linfocitos. Este valor que es casi el límite que se considera generalmente aceptable para una desviación standard, no puede ser considerado como de estimulación. Además, no señalan, en ningún caso el valor del % de estimulación encontrado por ellos para los cultivos mixtos autólogos linfocitos-espermatozoides, que parecen más importantes que los valores del cultivo mixto autólogo linfocitos-linfocitos, sobre todo si se pretende definir una respuesta a aloantígeno.

Hay que señalar, además, que estas estimulaciones pudieran ser debidas a la presencia de células seminales no espermatozoides que pudieran contaminar sus preparaciones.

Nuestros resultados en cultivos mixtos linfocitos-células seminales no espermatozoides pertenecientes a ambas células, a individuos previamente tipados para el locus HLA-D muestran una buena correlación entre las estimulaciones encontradas en los cultivos mixtos linfocitos-células seminales no espermatozoides y las que se esperarían en función del fenotipo HLA-D de los individuos utilizados. Figura 17.

A pesar del pequeño número de combinaciones utilizadas y de que no ha sido posible realizar cultivos mixtos entre individuos HLA-D idénticos, aparte de los cultivos autólogos linfocitos-células seminales no espermatozoides, nuestros resultados no descartan la posibilidad de que estos determinantes HLA-D estén presentes en las células seminales no espermatozoides. Los linfocitos y macrófagos presentes en el semen expresan sin duda determinantes HLA-D (véase en la Introducción, Distribución Tisular de los Antígenos HLA).

Las ocasionales estimulaciones encontradas en el cultivo mixto espermatozoides-linfocitos, con espermatozoides purificados, pueden tener su origen en sistemas genéticos diferentes del HLA-D, codificados en otras regiones del Sistema HLA o incluso fuera del Sistema HLA.

Dentro de esta señalada ausencia de productos de la región HLA-D/DR en espermatozoides hay que indicar que recientemente Levis y Dattner, 1979, han presentado pruebas de que los linfocitos sensibilizados en cultivo mixto con preparaciones de espermatozoides (1) no son capaces de originar una respuesta secundaria cuando se reestiman con los mismos espermatozoides, aunque sí parecen responder en cultivo secundario a linfocitos del donante de los espermatozoides utilizados en la sensibilización.

Resultados preliminares obtenidos por nosotros, muestran que los linfocitos sensibilizados en cultivo mixto frente a linfocitos (Mit. C) de un individuo son incapaces de responder en cultivo secundario a los espermatozoides purificados de ese mismo individuo, mientras que lo hacen perfectamente cuando son los linfocitos los utilizados en la reestimulación.

(1) No creemos que pueda descartarse que esta sensibilización pudiera ser debida a células seminales no espermatozoides que contaminaran las preparaciones de espermatozoides utilizadas por estos autores.

De nuestros resultados, podemos concluir que los productos de la región HLA-D/DR no están presentes en los espermatozoides, hecho que junto con la general y buena correlación, con algunas excepciones, entre los antígenos HLA-D y HLA-DR, va a favor de la estrecha relación a nivel genético y antigénico de los productos HLA-D y HLA-DR

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- Los antígenos de los loci HLA-A y HLA-B se encuentran en la superficie de los espermatozoides, aunque en menor cantidad que en linfocitos o en otras células seminales.
- 2.- Los antígenos de los loci HLA-C, HLA-Bw4, Bw6 y HLA-DR no se encuentran en la superficie de los espermatozoides.
- 3.- Los espermatozoides no llevan Factor B de la vía alternativa del complemento.
- 4.- Las irregulares estimulaciones del cultivo mixto espermatozoides-linfocitos no son debidas a productos HLA-D que estuviesen presentes en la superficie de los espermatozoides, ni a otros productos ligados al sexo.
- 5.- Células seminales no espermatozoides son las responsables de la estimulación de los linfocitos en cultivo mixto por preparaciones de espermatozoides encontradas por otros autores; no se descarta la presencia de determinantes HLA-D en estas células seminales no espermatozoides.
- 6.- Se encuentra en general buena correlación, con algunas excepciones, entre las especificidades HLA-D y HLA-DR en la población española; ello junto con su ausencia en espermatozoides va a favor de que los productos HLA-D y HLA-DR estén relacionados a nivel genético y antigénico.
- 7.- Las conclusiones anteriores indican que probablemente existe una expresión selectiva en espermatozoides de productos de loci HLA muy próximos entre sí.

BIBLIOGRAFIA

- ALBERT, E.D. y SCHOLZ, S. (1978) Behring Inst. Mitt. 62, 21-52
- ALPER, C.A.; BOEKISCH, T. y WATSON, L. (1972) J. Exp. Med. 135, 68-80
- ALPER C.A. (1976) J. Exp. Med. 144, 1111-1115
- ALLEN, F.H. (1974) Vox Sang. 27, 382-384
- AMIEL, J.L. (1967) Histocompatibility Testing 1967, p.79 (Munksgaard, Copenhagen)
- AMOS, D.B.; SEIGLER, H.F.; SOUTHWORTH, J.G. y WARD, F.E. (1969) Transplantm. Proc. 1, 342-346
- ARNAIZ VILLENA, A. Y FESTENSTEIN, H. (1975) Nature (London) 258, 734-736
- ARNAIZ VILLENA, A. y FESTENSTEIN, H. (1976) The Lancet II, 707-709
- ARNAIZ VILLENA, A.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; DUJOVNE, I.L.; REGUEIRO, J.R.; BOOTELLO, A.; SERRANO-RIOS, M. (1980a) New Engl. J. Med. 18, 1065
- ARNAIZ VILLENA, A.; LOPEZ LARREA, C.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; BOOTELLO, A.; ZEA, A.; BELTRAN, J. y GONZALEZ LANZA, M. (1980b) Symposium Internacional HLA y Enfermedad, Madrid, (Mayo 1980). Libro de resúmenes p.75
- ARNAIZ VILLENA, A.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; NAVARRETE, F.; PASCUAL, J.C.; CERVERO, J. y BOOTELLO, A. (1981a) Human Genetics (en prensa)
- ARNAIZ VILLENA, A.; LOPEZ LARREA, C.; LEYVA, F. y BOOTELLO, A. (1981b) Transplantation (en prensa)

- ARTZT, K. y BENNETT, D. (1975) *Nature (London)* 256, 545-547.
- AYRES, J. y CRESSWELL, D. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 794-799
- BACH, F.H. y HIRSCHHORN, K. (1964) *Science* 143, 813-814
- BACH, F.H. y VOYNOWNK. (1966) *Science* 153, 545-547
- BACH, F.N. y AMOS, D.B. (1967) *Science* 156, 1506-1508
- BAIN, B.; VAS, M.R. y LOWENSTEIN, L. (1964) *Blood* 23, 108-116
- BAIN, B. y LOWENSTEIN, L. (1964) *Science* 145, 1315- 1316
- BARNSTABLE, C.J.; JONES, E.A.; BODMER, W.F.; BODMER, J.G.; ARCE-GOMEZ, B.; SNARY, D. y CRUMPTON, M.J. (1977) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 41, 443-455
- BARNSTABLE, C.J.; JONES, E.A. y CRUMPTON, M.J. (1978) *Br. Med. Bull.* 34, 241-246
- BENACERRAF, B. (1974) *Scand. J. Immunol.* 3, 381-386
- BENACERRAF, B. y GERMAIN, R.N. (1978) *Immunol. Rev.* 38, 70-119
- BENDER, K.; MAYEROVA, A.; FRANK, R.; HILLEK, C. y WIENKER, T. (1977) *Hum. Genet.* 36, 191-196
- BERGER, R.; BERNHEIM, A.; SASPORTES, M.; HAUPTMANN, G.; HORS, J.; LEGRAND, L. y FELLOUS, M. (1979) *Clinical Genetics* 15, 245-251
- BERGHOLTZ, B.O. y THORSBY, E. (1977) *Scand. J. Immunol.* 6, 779-786

- BERNOCO, D.; CULLEN, S.; SCUDELLER, G.; TRINCHIERI, G. y CEPPELLINI, R.
(1973) *Histocompatibility Testing 1972*, pp. 527-537 (Munksgaard, Copenhagen)
- BILDSE, P.E.R.; FNESLEBEN-SORENSEN, S.; PETTIROSSI, O. y SIMONSEN, H.
(1970) *Transplant. Rev.* 3, 36
- BLUMENTHAL, M.N.; AMOS, D.B.; NOREEN, H.; MENDELL, N.R.; YUNIS, E.J.
(1974) *Science* 184, 1301
- BODMER, J.G. (1978) *Br. Med. Bull.* 34, 233-240
- BODMER, W.F. (1972) *Nature (London)* 237, 139-145 y 183
- BODMER, W.F. y BODMER, J.G. (1978) *Br. Med. Bull.* 34, 309-316
- BODMER, W.F.; BACHELOR, J.R.; BODMER, J.G.; FESTENSTEIN, H.
y MORRIS, P.J. (1978), *Histocompatibility Testing 1977* (Munksgaard, Copenhagen)
- BRADLEY, B.A.; SHEEHY, M.; KEUNING, J.J.; TERMIJTELEN, A.; FRANKS, D.
y van ROOD, J.J. (1976) *Immunogenetics* 3, 573-582
- BRADLEY, B.A.; OLIVER, R.T.D.; MENDELL, N. y SLEVENS, A. (1978) pp. 142-152
Histocompatibility Testing 1977 (Munksgaard, Copenhagen).
- BRANDAHM, P.E. y OWENS, S.J. (1978) *Heredity* 40, 165-169
- BREWBAKER, J.L.; GORREZ, D.D. (1967) *Amer. J. Bot.* 54, 611-616
- BREWERTON, D.A.; CAFFREY, M.; HART, F.D.; TAMES, D.C.O.; NICHOLLS,
A. y STURROCK, R.D. (1973) *The Lancet* 1, 904-907.

- BUBBERS, J.E.; CHEN, S. y LILLY, F. (1978) J. Exp. Med. 147, 340-351
- BUCKLEY, C.E.; DORSEY, F.C.; CORLEY, R.B.; RALPH, W.B.; WOODBURY, M.A. y AMOS, D.B. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 70, 2157-2161
- CEPPELLINI, R.; CURTONI, E.S.; MATTIUZ, P.L.; MIGGIANO, V.; SCUDELLER, G.; SERRA, A. (1967) Histocompatibility Testing 1967 pp. 149-185 (Munksgaard, Copenhagen).
- CEPPELLINI, R. III Workshop of Histocompatibility. Adv. Transplantn. pp. 195-202 (Munksgaard, Copenhagen) (1968).
- CEPPELLINI, R.; MATTIUZ, P.L.; SCUDELLER, G. y VISETTI, M. Transplantn Proc. 1, 385-389 (1969).
- CORLEY, R.B. (1979) in "HLA Antigens in Clinical Medicine and Biology" eds. Ferrone S., Curtoni, E. y Gorini, S. pp. 124-133. Garland, New York.
- CRUMPTON, M.J.; SANRY, D.; WALSH, F.S.; BARNSTABLE, C.J.; GOODFELLOW, P.N.; JONES, E.A. y BODMER, W.F. (1978), Proc. R. Soc. Lond. B. 202, 159-175.
- CUNNINGHAM, B.A. y BERGGARD, L. (1974) Transplantn. Rev. 21, 3-14
- CURRY, R.A.; DIERICH, M.P.; PELLEGRINO, M.A. y HOCH, J.A. (1976) Immunogenetics 3, 465-470
- CURTONI, E.S.; MATTIUZ, P.L. y TOSI, R.M. ed. (1967) Histocompatibility Testing 1967. (Munksgaard, Copenhagen).

- D'AGOSTINO, R.B. y TJEITGEN, G.L. (1971) *Biometrika* 58, 669
- DAUSSET, J. *Vox Sang.* 4, 190-198 (1954)
- DAUSSET, J. *Acta Haemat.* 20, 156-166 (1958)
- DAUSSET, J. y COLOMBANI, J. ed. (1973) *Histocompatibility Testing 1972* (Munksgaard, Copenhagen).
- DAUSSET, J.; IVANYI, P. e IVANYI, D. (1965). *Histocompatibility Testing 1965*, pp. 51-62 (Munksgaard, Copenhagen)
- DAUSSET, J. y SVEJGAARD, A. eds. (1977). *HLA and Disease* (Munksgaard, Copenhagen)
- DAUSSET, J. (1978) *Le complexe principal d'histocompatibilité a l'homme* (Cours 'superieur d'histocompatibilité')
- DEGOS, L.; DAUSSET, J. (1974) *Immunogenetics* 3, 195-210
- DEMANT, P.; CAPIKOVA, J.; HINZOVA, E y VORAKOVA, B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 70, 863-864
- DICKMEISS, E.; SOEBERG, B. Y SVEJGAARD, A. (1977) *Nature (London)* 270, 526-528.
- DOBERTY, P.C. Y ZINKERNAGEL, R.M. (1975) *The Lancet* I 1406-1409.
- DUPONT, B.; NIELSEN, L.; STAUB, Y SVEJGAARD, A. (1971) *The Lancet* II, 1336-1340.

- DUPONT, B.; HANSEN, J.A. Y YUNIS, E.J. (1976) *Adv. Immunol.* 23, 107-202
- EDWARDS, R.G.; FERGUSON, L.C. Y COOMBS, R.R.A. (1964) *J. Reprod. Fertil.* 7, 153
- EIJSSVOOGEL, V.D.; DUBOIS, M.J.G.; MELIEF, C.J.M.; GROOT-KOOY, M.L.; KONING, C.; VANROOD, J.J.; VAN LEEVWEN, A.; DU TOIT, E.Y. SCHELLEKENS, P. Th. A. (1972) *Histocompatibility Testing 1972*, pp. 502-510. (Munksgaard, Copenhagen).
- ERICKSON, R.P. (1977) *J. Immunogenetics* 4, 353-362
- EVANS, R.L.; FALDETTU, T.J. ; HUMPHREYS, R.E. et al., (1978) *J. Exp. Med.* 148, 1140-1145
- FELLOUS, M. Y DAUSSET, J. (1970) *Nature (London)* 225, 191-193
- FELLOUS, M.; COLLE, A. Y TONNELLE, C. (1976) *Eur. J. Immunol.* 6, 21-24
- FERRANDO, P.; SAN ROMAN, C.; RODRIGUEZ DE CORDOBA, S. Y ARNAIZ-VILLENA, A. (1981) *J. Med. Genet.* (en prensa).
- FERRARA (1980), comunicación personal.
- FESTENSTEIN, H.; SACHS, J.A.; PANS, A.M.I.; PEGRUM, G.D.; MOORHEAD, J.F. (1976) *The Lancet* 1, 157-160.
- FESTENSTEIN, H.; HALIM, K. Y ARNAIZ-VILLENA, A. (1977). *Scand. J. Immunol.* 6, 511-514
- FESTENSTEIN, H. Y HALIM, K. (1978), *Histocompatibility Testing 1977* p. 153-156 Eds. Bodmer, W. et al., (Munksgaard, Copenhagen).

FESTENSTEIN, H. ; HALIM, K. Y ARNAIZ-VILLENA, A. (1978), Sperms, Antibodies and Infertility, p. 11-23. Eds. J. Cohen y H.F. Hendry (Blackwell. Publ. Oxford).

FESTENSTEIN, et al., 1980, Posters Session, VIII "Workshop" of Histocompatibility, Los Angeles, Febrero 1980..

FRANCE TRANSPLANT, (1980) Rapport Annuel.

FRANCKE, V. PELLEGRINO, M.A. Proc. Nat. Acad. Sci. USA (1977) 74, 1147

FU, S.M.; CHIORAZZI, N.; WANG, C.Y. et al., (1978). J. Exp. Med. 148, 1423.

FUCKS, A.; KAUFMAN, J.F.; ORR, H.T.; PARHAM, P.; ROBB, R.J.; TERHOST, C. Y STROMINGER, J.L. (1977) Transplantn. Proc. 9, 1685

GALLY, J.A. Y EDELMAN, G.M. (1972) A. Rev. Genet. 6, 1-46

GOLDBERG, E.M.; AOKI, T.; BOYSE, E.A.; BENNETT, D. (1970) Nature (London) 228, 570-572

GOODFELLOW, P.N.; JONES, E.A.; VAN HEYNINGEN, V.; SOLOMON, E.; BOBROW, M.; MIGGIANO, V. Y BODMER, W.F. (1975) Nature (London) 254. 267-269

GÖTZE, D. (1977) ed. The Major Histocompatibility System in Man and Animals. Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York.

GOULMY, E.; TERMIJTELEN, A.; BRADLEY, B.A. Y VAN ROOD, J.J. (1977) Nature (London) 266, 544-545

- GREEN, I. (1974) Immunogenetics 1, 4-21
- GRUMET, F.C.; COLOMBE, B.W. Y GOODFELOW, P. (1978) Tissue Antigens 11, 39-44.
- GUTIERREZ, C.; BERNABE, R.; VEGA, J.; KREISLER, M. (1979) J. Immunol. Methods. 29, 57-63
- HALBWACHS, L. Y LACHMANN, P.J. (1976) Scand. J. Immunol. 5, 697-704
- HALIM, A.; ABBASI, K. Y FESTENSTEIN, H. (1974) Tissue Antigens 4, 1-6
- HALIM, K. Y FESTENSTEIN, H. (1975) The Lancet II, 1255-1256
- HALIM, K.; FESTENSTEIN, H. Y FARRANT (1979) J. Immunol. Methods. 25, 31-36
- HAMMERLING, G.J.; MAUVE, G.; GOLBERG, E. Y McDEVITT, H.O. (1975) Immunogenetics 1, 428-437
- HANSEN, G.S.; RUBIN, B. Y SORENSEN, S.F. (1977) Clin. Exp. Immunol. 29, 205-303
- HANSEN, G. S.; RUBIN, B.; SORENSEN, S.F. Y SVEJGAARD, A. (1978) Eur. J. Immunol. 7, 520-525
- HARDY, G.H. (1908) Science 28, 49-50
- HAUPTMANN, G.; SASPORTES, M.; TORIGIO, M.; MAYER, S Y DAUSSET, J. (1976a) Tissue Antigens 7, 52-54
- HAUPTMANN, G.; TORIGIO, M. Y MAYER, S. (1976b) Hum. Genet. 33, 275-278

- HAUPTMANN, G.; WERTHEIMER, E.; TORIGIO, M.Y. MAYER, S. (1977)
Human Genet. 36, 109-111
- HAYRY, P. Y ANDERSON, L.C. (1975) Cell. Immunol. 17, 165-171
- HIRSCHBERG, H. Y THORSBY, E. (1975) Transplantation 21, 343-347
- HOBART, M.J.; LACHMANN, J.P. (1976) Transplantn. Rev. 32, 26-42
- HORAI, S. (1976). Jap. J. Hum. Genet. 21, 177-186
- JOHANSEN, K. Y FESTENSTEIN, H. (1974) Br. Med. J. 202-203.
- JORGENSEN, F.; LAMM, L.U.; KISSMEYER-NIELSEN, F. (1973) Tissue Antigens
3, 323-339
- JOYSEY, V.C. Y WOLF, E. (1978) Br. Med. Bull. 34, 217-222
- KAUFMAN, J.F. Y STROMINGER, J.L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6567
- KAUFMAN, J.F.; ANDERSEN, R.L. Y STROMINGER, J.L. (1980) J. Exp. Med. 152, 37s-53s
- KEREK, G. Y AFZELIUS, B.A. (1972) Int. J. Fertil. 17, 120-126
- KEUNING, J.J. (1978) Typing for HLA-D (Thesis). Universidat de Leyden.
- KLEIN, J. (1975) Biology of the Mouse Histocompatibility-2 Complex (Springer,
New York).
- KISSMEYER-NIELSEN, F.; SVEJGAARD, A. Y HAUGE, H. (1968) Nature (London)
219, 116-119

KISSMEYER-NIELSEN, F.; SVEJGAARD, A. Y NIELSEN, L (1969) *Nature (London)* 224, 75-76

KISSMEYER-NIELSEN, F.; SORENSEN, J.F.; SVEJGAARD, A.; NIELSEN, L.,
STAUB Y THORSBY, E. (1970) *Nature (London)* 228, 63-65

KISSMEYER-NIELSEN, F. ed. (1975) *Histocompatibility Testing 1975* (Munksgaard, Copenhagen)

KORMAN, A. J.; PLOEGH, H. L.; KAUFMAN, J. F.; OWEN, M. J. Y STROMINGER, J. L.
(1980) *J. Exp. Med.* 152, 65s-82s

KRANGEL, M. S.; ORR, H. T. Y STROMINGER, J. L. (1979) *Cell*, 18, 979-991

LACHMANN, P. J.; GRENNAN, D.; MARTIN, A. Y DEMANT (1975), *Nature (London)* 258, 242-243

LACHMANN, P. J. Y HOBART, M. J. (1978a) *Br. Med. Bull.* 34, 247-252

LACHMANN, P. J. Y HOBART, M. J. (1978b) *Handbook of Experimental Immunology*, p. 5A.12, 3rd. Edition. Ed., D. N. Weir (Blackwell, Oxford).

LANDSTEINER, A. Y LEVINE, P. (1926) *J. Immunol.* 12, 415

LAMM, L. V.; KISSMEYER-NIELSEN, F.; SVEJGAARD, A.; BRUM, PETERSEN, G.;
THORSBY, E.; MAYR, W. Y HOGMAN, C. (1972) *Tissue Antigens* 2, 205-214

LAMM, L. V. ET AL., (1978) *Histocompatibility Testing 1977*, pp. (279-293)
(Munksgaard, Copenhagen)

LAW, H. Y.; BODMER, W. F. (1978) *Tissue Antigens* 12, 249-269

- VAN LEEVWEN, A.; SCHUTT, H.R.E. Y VAN ROOD, J.I. (1973) Transplantn.
Proc. 5, 1539-1542
- LEVIS, W.R. ; WHALEN, J.J. Y SHERINS, R.J. (1974) The Lancet II, 954-955
- LEVIS, W.R.; WHALEN, J.J. Y SHERINS, R.J. (1976) Science 191, 302-304
- LEVIS, W.R. Y DATTNER, A.M. (1979) J. Immunol. 122, 1986-1989
- LILLY, F.; BOYSE, E.A.; OLD, L.J. (1964) The Lancet II, 1207-1209
- LODGE, T.W. Y USHER, A. (1962) Vox Sang. 7, 329
- LOPEZ-LARREA, C.; BOOTELLO, A. Y ARNAIZ-VILLENA, A. (1981) Human,
Genet. (en prensa)
- LOHRMANN, H.D.; NOVIKOV, L. Y GRAW, R.G. (1974) Nature (London)
250, 144-145
- LOW, B.; MESSETER, L.; NANSSON, S. Y LINDHOLM, T. (1974) Tissue
Antigens 4, 405
- MATTIUZ, P.L.; INDE, D.; PIAZZA, A. et al., (1970) Histocompatibility Testing
1970 pp. 193-205 (Munksgarrd, Copenhagen)
- MAUFF, G.; HUMMEL, K.; Y PULVERER, G. (1975) Z. Immun-Forsch. Exp. Ther.
150, 327-338
- MAUFF, G.; GAUCHEL, F.D. Y HITZEROTH, H.W. (1976) Hum. Genet. 33, 319-322

MAWAS, C.E.; CHARMOT, D. Y SASPORTES, M. (1975) Immunogenetics 2, 449-463

McDEVITT, H.O. Y BENACERRAT, B. (1969) Adv. Immunol. 11, 31-74

McMICHAEL, A.J.; TING, A.; ZWEERINK, H.J. Y ASKONAS, B.A. (1977)
Nature (London) 270, 524-526

MEMPEL, W.; GROSSE-WILDE, H. Y BAUMANN, P. (1973) Transplantn. Proc. 5,
1529-1534

MENDELL, N.R.; GUPPY, D.; BODMER, W.F. Y FESTENSTEIN, H. (1978)
Histocompatibility Testing 1977 (Munksgaard, Copenhagen)

MEO, T.; ATKINSON, J.; BERNOCO, M.; BERNOCO, D. Y CEPPELLINI, R.
(1976) Eur. J. Immunol. 6, 916-919

MERRIT, A.D. ; PETERSEN, B.H.; ANGENIETA, A.B.; MEYERS, D.A.; BROOKS,
G.F. Y HODES. M.E. (1976) 3rd International Workshop on Human Gene
Mapping, Birth Defects, Vol. 12 No. 6. The National Foundation. New York.

MISKO, I.S.; BOETTCHER, B.; GRUSZYNSKI, R. (1978) The Lancet II, 479

MITTAL, K.; MICKEY, M.R.; SINGAL, D.P. Y TERASAKI, P.I. (1969) Transplantn.
6, 904-912

MITTAL, K.K. (1975) Fertility and Sterility 26, 704-710.

MOEN, T.; ALBRECHTSEN, D.; FLATMARK, A.; JACKOBSEN, A.; JERVELL, J.;
HALVORSEN, S.; SOLHEIM, B.G. Y THORSBY, E. (1980b) N. Engl. J. Med.
303, 850-854

- MOEN, T.; MOEN, M. Y THORSBY, E. (1980a) *Tissue Antigens* 15, 112-122
- MOLLER, G. (1972) *Transplantn. Rev.* 16
- NUÑEZ-ROLDAN, A.; SASPORTES, M. Y FRADELEZI, D. (1978) *Immunogenetics* 6, 43-54
- NUÑEZ-ROLDAN, A.; ARNAIZ-VILLENA, A.; NUÑEZ-OLLERO, G. (1979) *C.R. Acad. Sci.(Paris)* 288, 1719-1720
- OLAISEN, B. ; TEISBERG, P.; JONASSEN, R.; GEDDE-DAHT, T. Jr.; OLKING, J.M.; SIVERTS, A.; BRATHE, A Y THORSBY, E. (1978) *Cytogenet, Cell. Genet.* 22.
- O'NEILL, G.J.; YANG, S.Y.; TEGOLI, J.; BERGER, R. Y DUPONT, B. (1978) *Nature (London)* 273, 668-670
- OPELZ, G. Y TERASAKI, P.I. (1980) *Histocompatibility Testing 1980* (Munksgaard, Copenhagen) (en prensa)
- O'REILLY, R.J.; DUPONT, B.; PAHWA, S.; GRINCES, E.; SMITHWICK, E.M.; PAHWA, R.; SCHWARTZ, S.; HANSEN, J.A.; SIEGAL, R.P.; SORELL, M.; SVEJGARRD, A.; et al., (1977) *New Engl. J. Med.* 297, 1311-1318
- PARHAM, P.; ALBERT, B.N.; ORR, H.T.; STROMINGER, J.L. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 7555-7567
- PAYNE, R. Y ROLFS, H.R. (1958) *J. Clin. Invest.* 37, 1756-1763
- PLOEGH, H.L.; CANNON, L.E.; STROMINGER, J.L. (1979) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76, 2273-2277

- RAUM, D.; GLASS, D.; CARPENTER, G.; ALPER, C.A. Y SCHUR, P. (1976)
J. Clin. Invest. 58, 1240-1248
- RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; SERRANO-RIOS, M.; DUJOVNE, I.L.; SASTRE, A.;
BOOTELLO, A. Y ARNAIZ-VILLENA, A (1980) Symposion Internacional HLA Y
Enfermedad, Madrid, (Mayo 1980) Libro de resúmenes, pág. 13.
- RODRIGUEZ DE CORDOBA, S.; BOOTELLO, A. Y ARNAIZ-VILLENA, A. (1981),
Tissue Antigens (en prensa)
- VAN ROOD, J.J.; VAN LEEVWEN, A. Y EERNISSE, J.G. (1958) Nature (London)
181, 1735-1736
- VAN ROOD, J.J. (1962) Leucocyte Grouping: A Method and its application
(Pasmans, Haag).
- VAN ROOD, J.J. Y VAN LEEVWEN, A. (1963). J. Clin. Invest. 42, 1382-1390
- VAN ROOD, J.J.; LEEVWEN, A.; SCHIPPERS, A.; VOOYS, W.H.; FREDERIKS, H.;
BALNER, H. Y EERNISE, J.G. (1965) Histocompatibility Testing 1965, pp.37-50
(Munksgaard, Copenhagen)
- VAN ROOD, J.J.; VAN LEEVWEN, A.; KEUNING, J.J. Y BLUSSE VAN OUD
ALBLAS, A. (1975). Tissue Antigens, 5, 73-79
- ROSENTHAL, A.S. Y SHEVACH, E.M. (1973) J. Exp. Med. 138, 1194
- ROSENTHAL, A.S. (1978). Immunol. Rev. 40, 136-152
- RITTNER, C.; VALENTINE-THON, E.; BERTRAMS, J. ; GROSSE-WILDE, H. Y
SCHNEIDER, M. (1979). 8th International Histocompatibility Newsletters 1979.
- RUBINSTEIN, P. Y SUCIO-FOCA, N. (1977) Tissue Antigens, 10, 166 (Resumen)

RYDER, L.P. Y SVEJGAARD, A. (1976) "Associations between HLA and Disease. Report from the HLA and Disease Registry of Copenhagen." Publicado por los autores, (Copenhagen).

RYDER, L.P.; THOMPSON, M.; PLATZ, P. ; SVEJGAARD, A. (1975) Histocompatibility Testing 1975 (Munksgaard, Copenhagen).

SAKAI, A. Y SIMONSEN, M. (1969) Transplantation 7, 444-450

SALMON, S.E.; KRAKAWER, R.S. Y WHITMORE, W.F. (1971) Science 172, 490-495

SANDBERG, L.; THORSBY, E.; KISSMEYER-NIELSEN Y LINDHOLM, A. (1970) Histocompatibility Testing 1970. pp. 165-169 (Munksgaard, Copenhagen).

SASPORTES, M. ;FRADELIZI, D.; NUÑEZ-ROLDAN, A.; WOLLMAN, E.; GIANNOPOULOS, Z. Y DAUSSET, J. (1978a) Immunogenetics 6, 29-42

SASPORTES, M.; NUÑEZ-ROLDAN, A.; FRADELIZI, D. (1978b) Immunogenetics 6, 55-68

SCHERZ, R.; PFLUGSHAUP, R. Y BUTLER, R. (1977). Hum. Hered, 27, 143-146

SCHLOSSTEIN, L. ; TERASAKI, T.I.; BLUESTONE, R.; Y PEARSON, C.H. (1973) N. Engl. J. Med. 288, 704-706

SCHREUDER, I.; MEO, T.; TERMIJTELEN, A.; MEERA KHAN, P. (1979) 8th International Histocompatibility Newsletters 1979.

SHAW, S.; ARMEAD, H.J.; SHEARER, G.H. (1980) J. Exp. Med. 152, 565-580

- SHEEHY, M.J.; SONDEL, P.M.; BACH, M.L.; WANK, R. Y BACH, F.H. (1975)
Science 188, 1308-1310
- SHEARER, G.M. (1974) Eur. J. Immunol. 4, 527
- SHEVACH, E.M. Y ROSENTHAL, A.S. (1973) J. Exp. Med. 138, 1213
- SCHULMAN, N.R.; ASTER, R.H.; PEARSON, H.A. Y MILLER, H.C. (1962)
J. Clin. Invest. 41, 1059-1069
- SCHULMAN, N.R.; MARDER, J.J.; MILLER, M.C. Y COLLIER, E.M. (1964)
Prog. Haemat. 4, 222-304
- SIMONSEN, M. (1976) Transplantn. Proc. 8, 329-333
- SINGAL, D.P.; MICKEY, M.R. Y TERASAKI, P.I. (1969). Transplantation 7, 246
- SINGAL, D.P.; NAIPAUL, N. Y JOSEPH, S. (1980) Tissue Antigens 16, 274-285
- SNARY, D.; BARNSTABLE, C.J.; BODMER, W.F. Y CRUMPTON, M.J. (1977)
Eur. J. Immunol. 7, 580-585
- SOLHEIM, B.G.; BRATLIE, A.; SANDBERG, L.; NIELSEN, L.; STAUB Y THORSBY,
E. (1973). Tissue Antigens 3, 439-463
- VAN SOMEREN, H.; WESTERVELD, A.; HEGEMEIJER, A.; MEES, J.R.;
MERRA KHAN, P. Y ZAALBERG, O.B. (1974) Proc. Nat. Acad. Sci. USA
71, 962
- STINGL, G.; KATZ, S.I.; ABELSON, L.D., et al., (1978) J. Immunol. 120, 661

STROMINGER, J.L.; EGGLEHARD, V.H.; FLOCKS, A.; et al. (1980) "The Role of the Major Histocompatibility Complex in Immunobiology", B. Benacerraf y M.E. Dorf eds., Garland Publishing Inc., New York (en prensa)

SUCIO-FOCA, N. Y RUBINSTEIN, P. (1977) Transplantn. Proc. 9, 385-391

SUCIO-FOCA, N.; SUSINNO, E. ; NICHOLSON, J.; FOTINO, M.; MOLINARO, A.P. Y RUBINSTEIN, P. (1977) Transplantn. Proc. 9, 1751-1754

SUCIO-FOCA, N.; WEINER, J. ; ROHOWSKY, C.; McKIERNAN, P.; SUSINNO, E. Y RUBINSTEIN, P. (1978a) Transplantn. Proc. 4, 799-804

SUCIO-FOCA, N.; SUSINNO, E.; McKIERNAN, P.; ROHOWSKY, C., WEINER, J. Y RUBINSTEIN, P. (1978b) Transplantn. Proc. 4, 845-848

SUCIO-FOCA, N.; GODFREY, H.; ROHOWSKY, C.; KHAN, R.; SUSINNO, E. Y HARDY, M. (1979), 8th. International Histocompatibility Newsletters 1979.

SVEJGAARD, A.; BRATLIE, A.; HOGMAN, C.; JERSILD, C.; KISSMEYER-NIELSEN, F.; LINDBLOM, B.; LINDBLOM, A.; LOW, B.; MESSETER, L.; MOLLER, E.; SANDBERG, L.; NIELSEN, L. STAUB Y THORSBY, E. (1971) Tissue Antigens 1, 81-88 .

TEISBERG, P.; OLAISEN, B.; JONANSEN, R.; GEDDE-DAHL, T.J. Y THORSBY, E. (1977) J.Exp.Med. 146, 1380-1389

TERASAKI, P.I.; et al., eds. (1980) Histocompatibility Testing 1980 (Munksgaard, Copenhagen) (en prensa)

TERASAKI, P.I. ed. (1970) Histocompatibility Testing 1970 (Munksgaard, Copenhagen)

- TERASAKI, P.I. Y McCLELLAND, J.D. (1964) *Nature (London)* 204, 998-1000
- TERMIJTELEN, A.; BRADLEY, B.A. Y VAN ROOD, J.J. (1980) *Tissue Antigens* 15, 267-274.
- THORSBY, E.; HIRSCHBERG, H. Y HELGESEN, A. (1973) *Transplantn. Proc.* 5, 1523-1528
- THORSBY, E Y PIAZZA, A. (1975) *Histocompatibility Testing 1975*, pp 414-458, (Munksgaard, Copenhagen)
- TROUP, G.M.; CAPPER, J. Y DEVOR, E.J. (1979) *8th International Histocompatibility Newsletters 1979*, p.58
- TROUP, G.M.; JAMESON, J.; THOMSEN, M.; SVEJGAARD, A. Y WALFORD, R.L. (1978) *Tissue Antigens* 12, 44-57
- VAN DEN TWEEL, J.G.; BLUSSE VAN OUD ALBLAS, A. Y KEUNING, J.J. (1973) *Transplantn. Proc.* 5, 1535-1538
- VOJTISKOVA, M.; POLACKOVA, M. Y POKORNA, Z. (1969) *Fol. Biol. (Praga)* 15, 322-332
- WEIMBERG, W. (1908) *Jahresverum F. vaterl. Naturk in Wuttemberg* 64, 368-382
- WALSH, F.S. Y CRUMPTON, M.J. (1977) *Nature (London)* 269, 307-309

WERNET, P. (1976) Transplantn. Rev. 30, 271-298

WILSON, D.B. y NOWELL, P.C. (1970) J. Exp.Med. 131, 391-400

WILLIAMS, K.A.; HART, D.N.J.; FABRE, J.W. Y MORRIS, P.J. (1980) Transplan-
tation 29, 274-279

YUNIS, E.J. Y AMOS, D.B. (1971) Proc.Nath.Acad.Sci.USA 68, 3031

ZINKERNAGEL, R.M. Y DOHERTY, P.C. (1974) Nature (London) 248, 701-702

ZINKERNAGEL, R.M.; CALLAHAN, G.N.; KLEIN, J. Y DENNERT, G. (1978)
Nature (London) 271, 251-253

ZOSCHKE, D.C. Y BACH, F.H. (1971) Science 172, 1350-1352

